



Universidade Nova de Lisboa

Efeito da Minociclina em *Mus musculus*
infectados com *Trypanosoma brucei brucei*

Daniel José Dias Gonçalves

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM SAÚDE TROPICAL

JULHO DE 2011



Universidade Nova de Lisboa

Efeito da Minociclina em *Mus musculus* infectados com *Trypanosoma brucei brucei*

Daniel José Dias Gonçalves

(Licenciado)

Orientação: Doutor Marcelo Sousa Silva

Co-orientação: Prof. Doutor Jorge Atouguia

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Saúde Tropical, realizada sob a orientação científica de:

Doutor Marcelo Sousa Silva

Apoio financeiro do programa de cooperação bilateral entre
FCT (Portugal) e Capes (Brasil)

JULHO DE 2011

*Ao meu Pai e à minha Irmã;
Ao ponto de Luz mais brilhante de todo o Firmamento,
Que sei observar-nos e me conduz carinhosamente
Pelas sendas desta Vida: a minha Mãe.*

AGRADECIMENTOS

Tudo o que neste documento se apresenta não é obra de um só. Possui o carimbo do conhecimento que me foi transmitido por diferentes pessoas, a sabedoria do *saber-fazer* que não se retira de livros ou artigos científicos.

Ao Doutor Marcelo que sempre de forma descontraída me deixou evoluir num campo e em técnicas, para mim, totalmente desconhecidos. Agradeço-lhe porque me possibilitou desbravar saberes numa área nos antípodas da minha actividade laboral e de formação.

À Karina e à Andreia deixo o meu mais sincero e profundo obrigado. Agradeço-vos as intermináveis horas de paciência que tiveram comigo, um *bebé de colo* que agora começa a dar os primeiros passos nestas andanças de Laboratório. Mais do que o conhecimento que me transmitiram, estou certo de que ficou uma grande amizade entre nós.

À Paula pela presença sempre bem-disposta e com quem dois dedos de conversa animam o espírito em dias de resultados menos bons.

Também não posso de todo esquecer aqueles que indirectamente mostraram interesse no meu trabalho, servindo como um estímulo e motivação para continuar. Aos meus amigos e colegas do Instituto Português de Oncologia de Lisboa, obrigado por acreditarem em mim e me mimarem como só vocês sabem fazer.

À minha Família, por me terem educado de forma a querer tornar-me melhor, sem nunca esquecer valores que devem pautar o dia-a-dia, como a Humildade e a Sinceridade.

RESUMO

EFEITO DA MINOCICLINA EM *MUS MUSCULUS* INFECTADOS COM

TRYPANOSOMA BRUCEI BRUCEI

DANIEL GONÇALVES

As patologias provocadas tanto em humanos como em outros mamíferos, pelo parasita hemoflagelado *Trypanosoma brucei* são um verdadeiro flagelo em África, matando milhares de pessoas e cabeças de gado todos os anos. No caso da terapêutica humana, todas as drogas foram implementadas em meados do século XX, sem novas patentes desde 1981. Urge portanto a descoberta de novas moléculas, que em esquema monoterapêutico ou em associação, possam de alguma forma intervir no controlo do parasita ou contra a inflamação provocada pelas sucessivas ondas de parasitémia.

Em estudos anteriores a minociclina, tetraciclina de 2ª geração, provou ser eficaz na protecção do sistema nervoso central (SNC) de ratos infectados com *Trypanosoma brucei brucei* (*T.b.brucei*), diminuindo a passagem pela barreira hemato-encefálica (BHE) de leucócitos e parasitas. No presente estudo, o efeito dessa droga parece estar relacionado com uma maior resistência à perda de vários componentes hematológicos como eritrócitos, leucócitos ou granulócitos em amostras de animais com vinte dias (20 DPI) de progressão de infecção com o parasita. Também as parasitémias são substancialmente mais baixas (cerca de dez vezes menores) nos animais tratados em 20 DPI. Em termos das citocinas interleucina 4 (IL-4), interferão gama (IFN- γ) e óxido nítrico (NO), parece existir um padrão de secreção diferente nos animais tratados e não tratados. A IL-4 parece neste caso estar associada a um perfil anti-inflamatório; o NO, importante no controlo do parasita, existe em maiores quantidades nos animais tratados, ao contrário do IFN- γ com quantidades mais elevadas nos animais controlos. Esta última citocina está escrita na literatura como factor de crescimento parasitário.

A expressão de metaloproteínases é aparentemente superior no baço quando comparada com tecido hepático, contudo sem aparentes diferenças entre os dois grupos persistindo um sistema de dupla banda compreendidas entre r de 30 e 40 kDa, valores

de massa molecular, na maioria dos animais dos dois grupos. As metaloproteinases podem ser endógenas do hospedeiro, mas com elevada possibilidade de serem secretadas pelo parasita no seu processo de invasão tecidual.

Palavras-Chave: *Trypanosoma brucei brucei*, minociclina, citocinas, metaloproteinases, inflamação

ÍNDICE

1 - Introdução	5
1.1 - Objectivos	7
1.2 - Os tripanossomas	8
1.3 - Tripanossomoses animais	9
1.4 - Tripanossomose Humana Africana	11
1.5 - Biologia do <i>Trypanosoma brucei</i>	14
1.6 - Interação entre sistema imunitário e <i>Trypanosoma brucei</i>	22
1.7 - Biologia e fisiologia das Metaloproteínas	25
1.8 - Tetraciclina	28
 2 - Material e Métodos	 31
2.1 - Animais e Parasitas	31
2.1 - Tratamento farmacológico com Minocin[®]	31
2.2 - Dados biométricos	32
2.3 - Obtenção de Material biológico	33
2.4 - Determinação de mediadores inflamatórios nos murganhos infectados	34
2.4.1 - Quantificação de Óxido Nítrico (NO)	34
2.4.2 - Quantificação de Interleucina (IL)-4 sérica	35
2.4.3 - Quantificação de Interferão (IFN)- γ	37

2.4.4 -	Determinação de Anticorpos específicos anti - <i>T.b.brucei</i>	38
2.5 -	Obtenção e quantificação de RNA em amostras de fígado e de baço dos animais infectados	39
2.6 -	Obtenção e quantificação de cDNA das amostras de fígado e baço dos animais infectados	40
2.7 -	Optimização de PCR para interleucinas e metaloproteinases.....	41
2.8 -	Actividade de Metaloproteinases por zimografia	43
2.9 -	Amostragem e tratamento estatístico	45

3 - Resultados 46

3.1 -	Dados de medição directa	46
3.2 -	Valores hematológicos.....	50
3.2.1 -	Parasitémia.....	50
3.2.2 -	Eritrograma	51
3.2.3 -	Leucograma	54
3.3 -	IL-4, INF- γ e Óxido Nítrico séricos.....	57
3.4 -	Anticorpos anti- <i>T.b. brucei</i>	60
3.5 -	Metaloproteinases com acção sobre gelatina bovina	62
3.6 -	Optimização dos protocolos de PCR	69

4 - Discussão e Conclusões 75

4.1 -	Fundamentação dos resultados	75
4.2 -	Conclusões	85

4.3 - Limitações	88
4.4 - Perspectivas futuras	89

Referências bibliográficas	90
LISTA DE TABELAS	99
LISTA DE FIGURAS	99
LISTA DE GRÁFICOS	101
ANEXO — <i>Concentrações e grau de pureza do RNA total obtido</i>	103

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácido
Abs	Absorvância
ATP	<i>adenosine triphosphate</i>
B-ES	<i>Bloodstream expression site(s)</i>
BHE	Barreira hemato-encefálica
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
CATT	<i>card agglutination trypanosomiasis test</i>
cel.	célula(s)
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CMT	<i>Chemically modified tetracycline(s)</i>
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
DNA	<i>Desoxiribonucleic acid</i>
DO	Densidade óptica
DPI	dias pós infecção
EDTA	<i>Ethilenediamine tetraacetic acid</i>
EGF	<i>Epidermic growing factor</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay(s)</i>
ESAG	<i>Expression site associated genes</i>

G.	<i>Glossina</i>
GPI	<i>Glycosyl-phosphadityl-isonitol</i>
GPI-PLC	<i>Glycosyl-phosphadityl-isonitol phospholipase C</i>
i.m.	Intramuscular
i.v.	Intravenoso
IFN-γ	Interferão gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IHMT	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
IL	Interleucina
kDNA	<i>Kinetoplast DNA</i>
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MEC	Matriz extracelular
M-ES	<i>Metacyclic expression site(s)</i>
MMP	Metaloproteinase(s)
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MSP	<i>Major surface protein(s)</i>
NED	<i>N-naphtyl-ethylenodiamine dihydrochloride</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NO	Óxido Nítrico

OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	<i>o-fenil-diamine</i>
par./leu.	parasitas por leucócito
PARP	<i>Procyclic acidic repetitive protein(s)</i>
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polimerase chain reaccion</i>
q.b.	Quanto baste
rpm	rotações por minuto
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT-PCR	<i>Real time polimerase chain reaccion</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SIF	<i>Stumpy inductor factor</i>
SNC	Sistema nervoso central
SRA	<i>Serum resistance associated gene</i>
TAA	Tripanossomose Africana Animal
TAE	<i>Tris-acetate-EDTA</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TbMSP	<i>Trypanosoma brucei major surface protein</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i>

TGF-β	<i>Transforming growing factor beta</i>
Th1	Linfócitos T <i>helper</i> tipo I
Th2	Linfócito T <i>helper</i> tipo II
THA	Tripanossomose Humana Africana
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase(s)</i>
TLTF	<i>Trypanosome-lymphocyte triggering factor</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TRIS-HCl	<i>Tris (hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride</i>
tRNA	<i>Transfer RNA</i>
VAT	<i>Variant antigenic type(s)</i>
VSG	<i>Variable surface glycoprotein(s)</i>
UV	Ultra-violeta

1 - Introdução

Os protozoários do género *Trypanosoma* são parasitas que causam diversas doenças infecciosas para o Homem e muitos animais. Patologias como a doença de Chagas (Tripanosomose Americana), causada pelo *Trypanosoma cruzi*, ou a doença do sono (Tripanossomose Africana), causada pelo *Trypanosoma brucei*, constituem verdadeiros problemas de saúde humana e animal, em populações que convivem com os insectos vectores. Podem ainda destacar-se as infecções causadas pelo parasita *Trypanosoma evansi*, com grande impacto na saúde animal nas Américas e na Ásia (Hoare, 1972). No contexto da Tripanossomose Africana Animal, milhares de cabeças de gado sucumbem, nesse continente à doença designada *Nagana* provocada pelos *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma congolense* e subespécies de *Trypanosoma brucei* (Hoare, 1972). Em populações humanas rurais que dependem, em grande parte, da pastorícia e dos animais como ferramentas a utilizar numa agricultura de subsistência, a perda dos rebanhos vem muitas vezes acentuar a condição de miséria em que vivem essas comunidades, habitando muitas delas em zonas de conflitos armados (Perry *et al.*, 2002; Ford, 2007).

A luta pela contenção das vertentes humana e animal da doença causada por tripanossomas é, no continente Africano, multifactorial na tentativa de resolução do problema. As principais medidas no controlo do vector, a mosca tsé-tsé (*Glossina spp.*), baseiam-se principalmente na utilização de armadilhas e pesticidas (Fèvre *et al.*, 2006). Por outro lado, o desenvolvimento de vacinas para a Tripanossomose Africana representa um forte desafio, uma vez que o parasita apresenta um complexo sistema de interacção com o sistema imunitário do hospedeiro (Satoskar *et al.* 2009). Entretanto, inúmeros protocolos experimentais têm sido desenvolvidos no sentido de investigar uma vacina para este protozoário (Lança *et al.*, 2011; Rasooly e Nalaban, 2004, Silva *et al.*, 2009).

No que diz respeito à terapêutica, as drogas utilizadas no tratamento da doença do sono, seja a forma africana ocidental, causada por *Trypanosoma brucei gambiense* (*T.b. gambiense*) ou a forma africana oriental, relacionada com o *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T.b. rhodesiense*), são cada vez mais ineficazes. Tal deve-se principalmente ao aumento de resistências por parte dos parasitas aos tratamentos instituídos (Milord, *et al.*, 1993). Por outro lado, as drogas actualmente utilizadas têm a sua génese até meados do século XX, apresentando elevado grau de toxicidade para os pacientes tratados (Fairlamb, 1990). Por exemplo, o melarsoprol, utilizado na terapêutica de eleição no tratamento da doença quando esta envolve o sistema nervoso central, pode provocar encefalopatia reactiva numa percentagem considerável de pessoas tratadas, levando nalguns casos à morte (Legros *et al.*, 2002).

Mais recentemente, diferentes estratégias vêm sendo utilizadas no desenvolvimento de novos fármacos, baseando-se na alteração do curso natural dos processos imunes e fisiopatológicos, durante uma infecção ou outra patologia não-infecciosa. Neste contexto, estratégias para a inibição de processos inflamatórios têm sido utilizadas em infecções parasitárias (Masocha *et al.*, 2006, Irjanheikki *et al.*, 1999) que visam a redução da secreção de mediadores pró-inflamatórios e ainda que não contribuam para a eliminação do parasita, podem exercer actividade ao nível do controlo dos danos patológicos durante uma determinada infecção.

Vários dados na literatura mostram um importante papel dos derivados da tetraciclina como interessantes substâncias com capacidade de redução dos processos inflamatórios, além da sua inerente actividade antimicrobiana (Burggraf *et al.*, 2006; Masocha *et al.*, 2006; Irjanheikki *et al.*, 1999). Como exemplos, os resultados recentemente apresentados por Burggraf e colaboradores (2006) mostram que a doxiciclina exerce uma função neuroprotectora em animais submetidos a isquémia cerebral induzida, estando este fenómeno associado à actividade inibitória da doxiciclina sobre as metaloproteinases (mais concretamente as gelatinases). Neste cenário, outro interessante estudo mostrou experimentalmente que a minociclina apresenta a propriedade de inibir a inflamação neurológica induzida em murganhos infectados com *Trypanosoma brucei brucei* (Masocha *et al.*, 2006). Estes autores demonstraram uma diminuição na migração leucocitária e parasitária para o cérebro dos animais infectados, reduzindo assim os danos inflamatórios cerebrais.

1.1 - Objectivos

No contexto apresentado até ao momento, a justificação central deste trabalho de tese é gerar novos dados que contribuam para a melhor compreensão do papel imunofarmacológico da minociclina no contexto da infecção experimental com *Trypanosoma brucei brucei*. Desta forma propõe-se como objectivo geral do estudo a caracterização da expressão de mediadores pró e anti-inflamatórios no soro, fígado e baço de um grupo de murganhos *Mus musculus*, infectados com *Trypanosoma brucei brucei*, sujeitos a quimioterapia “per os” com minociclina. São propostos como objectivos específicos:

- (1) Avaliar a massa corporal dos animais submetidos à quimioterapia com minociclina;
- (2) Comparar possíveis alterações comportamentais dos murganhos tratados com minociclina ao longo do tempo;
- (3) Avaliar a influência da minociclina na carga parasitária dos animais submetidos ao tratamento;
- (4) Avaliar a evolução do fenómeno de esplenomegália dos animais submetidos ao tratamento com minociclina;
- (5) Determinar os valores de hemograma e de eritrograma no curso da infecção e tratamento dos animais;
- (6) Avaliar a produção de mediadores inflamatórios (IFN- γ , IL-4 e óxido nítrico) no curso da infecção e tratamento dos animais;
- (7) Determinar a produção de anticorpos anti-*T. b. brucei* (IgG e IgM) no curso da infecção e tratamento dos animais;
- (8) Avaliar por zimografia a produção de metaloproteinases em amostras de fígado e de baço nos animais infectados e submetidos ao tratamento com minociclina;
- (9) Avaliar por PCR quantitativa os níveis de expressão de IL-2, -4, -6 em amostras de fígado e baço nos animais tratados com a minociclina;
- (10) Avaliar por RT-PCR os níveis de expressão de MMP-2, -9 e -12 em amostras de fígado e baço nos animais tratados com minociclina

Identificados os objectivos geral e específicos importa contextualizar teoricamente o estudo. Utiliza-se uma organização dedutiva na exposição do tema partindo dos tripanossomas em geral para a biologia do *T.b.brucei* em particular. Faz-se também alusão à interacção do parasita com o sistema imunitário do hospedeiro mamífero e, continuando a contextualização do tema, segue-se a descrição do estado actual do conhecimento relativo à biologia e fisiopatologia das metaloproteínases, no decurso a infecção com *T. brucei*. Por último, expõem-se as propriedades da família da minociclina, além das características farmacológicas mais importantes do antibiótico usado.

1.2 - Os tripanossomas

Os parasitas pertencentes ao género *Trypanosoma* (Hoare, 1972) são protozoários unicelulares flagelados e podem ser encontrados nos líquidos corporais do hospedeiro mamífero infectado. São microorganismos que tanto podem afectar humanos (Barrett *et al.*, 2003) como animais, sejam domésticos ou selvagens (Hoare, 1972).

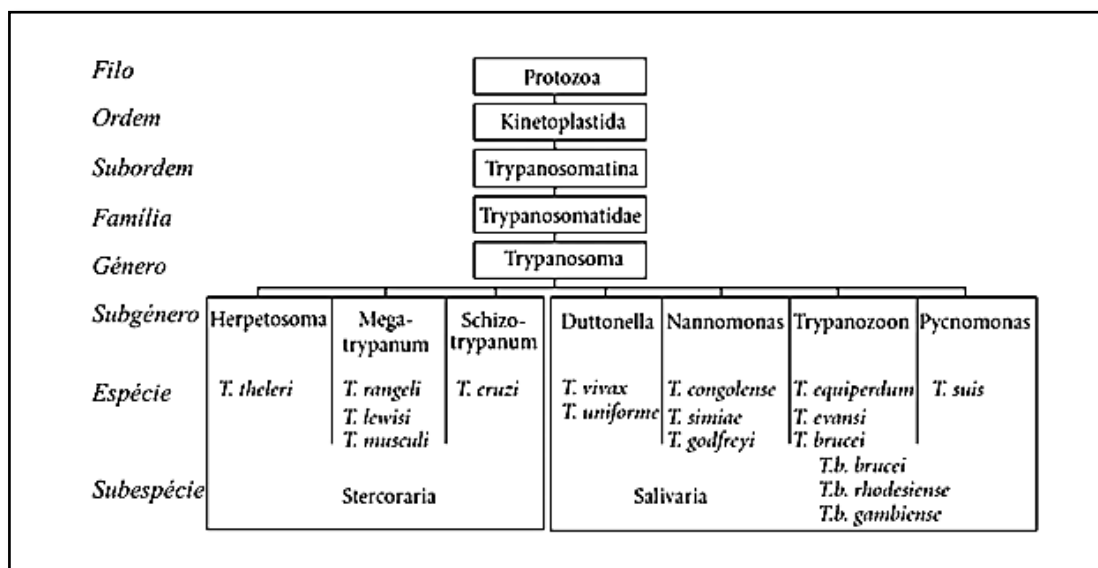


Figura 1.1 - **Classificação taxonómica dos tripanossomas dos mamíferos.** A espécie relevante para o estudo, *T.b. brucei*, pertence ao subgénero *Trypanozoon*, a par de outros tripanossomas como *T. evansi* e *T. equiperdum*.

FONTE: Adaptado de OMS (1986).

Como se pode ver na figura 1.1, os *Trypanosoma* dividem-se em dois grandes grupos, com base na forma de transmissão pelo vector: (1) *Stercoraria* em que o contágio ao hospedeiro se faz através de fezes infectadas do vector, (2) *Salivaria* onde o fluido que transporta os tripanossomas é a saliva do vector hematófago que infecta quando se alimenta (Faust *et al.*, 1987). O *Trypanosoma cruzi*, responsável pela Doença de Chagas na América Latina, é exemplo do primeiro grupo e no segundo grupo insere-se o *Trypanosoma brucei*, cujas subespécies *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *Trypanosoma brucei gambiense* causam a tripanossomose humana africana (THA).

1.3 - Tripanossomoses animais

Os diferentes tripanossomatídeos encontram-se disseminados por todo o globo terrestre e são agentes patológicos de relevo. Apesar de só alguns estados de doença tomarem o nome de “*tripanossomose*”, estes microrganismos causam doenças com outras designações. É o caso da doença venérea designada “durina” ou “mal do coito” devida à infecção por *Trypanosoma equiperdum*, que afecta equinos na Europa, América, norte de África e Índia (USAHA, 2008). Noutro caso, o *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*), o agente da patologia designada “surra” ou “*mal das cadeiras*”, é infectante para camelos, cavalos, gado, porcos, búfalos e cães em todo o planeta (Hoare, 1972). Este parasita é transmitido mecanicamente por moscas hematófagas, como o tabanídeo ou a mosca dos estábulos, e pode ser eventualmente fatal para estes animais (Service, 2001). Surgiram recentemente na Índia dois casos reportados de *T. evansi* (Joshi *et al.*, 2005; Powar *et al.*, 2006) em trabalhadores rurais, situação que se reveste de carácter excepcional visto ser um protozoário que sofre lise natural na presença de soro humano (Joshi *et al.*, 2005).

Focando o caso do continente africano, as formas que causam perdas economicamente mais relevantes a nível dos ruminantes são o *Trypanosoma congolense* (*T. congolense*) e o *Trypanosoma vivax* (*T. vivax*) podendo existir infecção com outros *salivaria*, dentre os quais o *T.b. brucei* (Westley, 1984). Causam perdas na ordem do bilião de dólares anuais (Satoskar *et al.*, 2009) e exigem todos eles a transmissão pelo vector hematófago obrigatório *Glossina spp* (Hoare, 1972). A “*Nagana*”, que em zulu designa um estado deprimido, nomeia a tripanossomose do gado que é responsável por travar o

desenvolvimento da pecuária e exploração dos recursos naturais (Perry *et al.*, 2002). Afecta directa e indirectamente as populações humanas pela perda de animais necessários à agricultura e de produtos como a carne ou os lacticínios (Finelle citado por Rush-ton, 2009). As populações rurais que vivem em zonas de transmissão da doença e dependem do pastoreio, caça, pesca e agricultura são as que, juntamente com o seu gado, se encontram mais expostas à picada das moscas e consequentemente em maior risco de contrair a doença (Simarro, 2008). Por não existirem fundos económicos apropriados e meios eficazes de controlo destas patologias, está criado um ciclo vicioso que não permite às populações sair de um estado de pobreza (Perry *et al.*, 2002).

Apesar das repercussões nefastas deste tipo de protozoários para os mamíferos, é possível a animais selvagens e domésticos viverem em zonas endémicas, sem necessitarem de quimioterapia. A capacidade de tripanotolerância (Murray *et al.*, 1979) permite a hienas, elandes e alguns antílopes do género *Tragelaphus* permanecerem infectados durante longos períodos controlando a anemia, sinal característico desta infecção. Gado como a raça bovina N'Dama é também considerado tripanotolerante por limitar a proliferação sanguínea dos tripanossomas (Vincendeau e Bouteille, 2005). O tratamento da tripanossomose animal restringe-se às áreas endémicas e é feito com recurso a três tripanocidas (Service, 2001): isometamídio (preferido como droga profilática), homídio, sob as formas de cloreto e brometo, e acetato de diminazeno, o Berenil®. Esta última droga é usada preferencialmente na quimioterapia no gado bovino (Bacchi, 2009). Todos os compostos surgiram após a década de 1960 e não são raros os casos de resistência tripanossomal (Matovua *et al.*, 2001). Outros compostos como a suramina e a quinapiramina encontram-se também em uso desde há muito neste tipo de patologia animal (Service, 2001).

O *T. brucei* é passível de ser transmitido a animais de laboratório (Westley, 1984). A inoculação de material infectante de proveniência humana, reservatório animal ou da *glossina* produz infecção num variado leque de animais. *T.b. rhodesiense* pode ser propagado a ratos, ratazanas, coelhos e porcos da Índia. *T.b. gambiense* só infecta ratos da espécie *Mastomys natalensis* e *Grammomys spp.* ou então ratos com deficiência imune combinada severa. O *T.b. gambiense* com proveniência de alguns locais, por exemplo dos Camarões, provou não ser transmissível a outros hospedeiros (Cook e Zumla, 2003). As interacções tripanossoma/hospedeiro levam no modelo animal ao apa-

recimento de sintomas relacionados com a perda de peso, pirexia, actividade locomotora comprometida e megálias hepática e esplénica. A anemia surge como um dos mais relevantes indicadores de gravidade da doença e possivelmente está relacionada com: (1) a libertação, por parte dos tripanossomas, de factores líticos para os glóbulos vermelhos, (2) pela lise das hemácias mediada por anticorpos ou fagocitose de eritrócitos opsonizados, ou ainda (3) por mecanismos de supressão da hematopoiese (Satoskar *et al.*, 2009).

1.4 - Tripanossomose Humana Africana

Durante séculos houve conhecimento de uma doença e da sua propensão para um distúrbio fatal do sono. Já os comerciantes de escravos rejeitavam os africanos apresentando tumefacções cervicais, por saberem ser gente que morreria dentro de pouco tempo (OMS, 2000). Apesar ser de conhecimento antigo, só durante o período de 1894 a 1910 é que o agente causal da doença do sono é reconhecido. A sua descoberta está associada a David Bruce, médico britânico, que em 1895 descobre tripanossomas no sangue de animais. O clínico afirma ainda que os parasitas são transmitidos pelas moscas tsé-tsé e que os animais selvagens funcionam como reservatórios dos agentes da *Nagana* (Atouguia, 2005). A doença do sono humana possui duas vertentes: a forma crónica, cujo agente é o *Trypanosoma brucei gambiense*, engloba 90% dos casos reportados e a forma aguda da doença, a antropozoonose causada pelo *Trypanosoma brucei rhodesiense*, representa menos de 10% dos casos registados (Simarro, 2008).

O *T.b. gambiense*, descrito por Joseph Dutton em 1902, é endémico ao longo da África Central e Ocidental, estando a infecção relacionada com as orlas dos cursos de água. Estes espaços são necessariamente frequentados pelas populações humanas e constituem o *habitat* do principal vector da forma *gambiense*: as *Glossina palpalis*. A picada de pessoas por *Glossina morsitans*, onde decorre parte do ciclo *rhodesiense*, acontece quando penetram na savana, o meio natural dessas moscas e está associada por exemplo a caçadores, turistas e madeireiros (Kasper *et al.*, 2005). Podem ainda servir de vectores do *T. brucei* as glossinas *G. tachinoides*, *G. pallidipes*, *G. swynnertoni* e *G. fuscipes* transmitindo o parasita entre os humanos e os reservatórios, animais domésticos ou selvagens (Chin, 2000).

A tripanossomose humana africana surge em 36 países da África sub-Sahariana. Os limites da doença são sobreponíveis à distribuição geográfica das *Glossina spp.* e representam cerca de 200 *microfoci* onde ocorre a transmissão pelos vectores (Stich *et al.*, 2002). Segundo a OMS (2001), a prevalência em todo o continente africano de ambas as formas da THA ronda os trezentos mil doentes com uma incidência de trinta mil casos anuais. Contudo, segundo a mesma Organização, é consensual a ideia de uma subestimação dos números reais, resultado de baixos rácios de detecção, com 60 milhões de pessoas em risco de contrair a doença do sono. Porém, tem-se assistido nos últimos anos a um declínio do número de casos reportados às autoridades de saúde, o que pode ser reflexo de um controlo de sucesso ou estar relacionado com uma análise estatística dos dados não desprovida de interesses (Satoskar *et al.*, 2009).

Existem dois estádios reconhecidos na representação clínica da tripanossomose humana africana: a fase I, inicial ou hemolinfática e a fase II, encefalítica ou fase tardia, onde existe um comprometimento do sistema nervoso central. Numa infecção por *T.b. rhodesiense*, a transição da fase inicial para a fase tardia nem sempre é perceptível, dada a rapidez com que a infecção progride (Cook e Zumla, 2003). Essa afecção central dá-se meses após a inoculação inicial pela mosca, ao passo que na infecção por *T.b. gambiense*, geralmente mais lenta, a fase encefalítica é atingida até vários anos após a infecção (Atouguia, 2005). O exame do líquido cefalorraquidiano (LCR) é um passo vital no processo diagnóstico (Chappuis *et al.*, 2005) pois ambas as formas da doença são fatais sem tratamento.

A correcta quimioterapia da THA depende da identificação também correcta do estadiamento da doença, sendo imperativa a terapêutica instituída precocemente (Stich *et al.*, 2002). O teste do cartão de aglutinação para tripanossomas (CATT, do inglês, *card agglutination trypanosomiasis test*) é um método serológico de elevada especificidade e sensibilidade, utilizado no terreno para a determinação da infecção com *gambiense*. (Satoskar *et al.*, 2009). Estão propostos, embora com resultados ambíguos até à data, o teste serológico indirecto que utiliza anticorpos específicos para reagir na presença de antígenos específicos e o teste rápido do cartão de látex (LATEX/ *T.b. gambiense*) (Chappuis *et al.*, 2005). Não se encontra desenvolvido nenhum teste comercializado para a forma *rhodesiense*, contudo Njiru e colaboradores (2004) utilizaram a detecção do SRA (do inglês, *serum resistance associated gene*), gene associado à resistên-

cia natural ao soro humano, para identificação deste parasita no reservatório animal. As técnicas de imunofluorescência como ELISA (do inglês, *enzyme linked Immunosorbent assay*) ou diferentes métodos de PCR (do inglês, *polimerase chain reaction*) são apenas de uso laboratorial, com difícil aplicação em campo mas importantes no despiste da presença de parasitas no SNC. O diagnóstico da fase II da patologia é determinado com a identificação de parasitas ou de leucócitos acima das 5 cel./ μ L no LCR ou pela presença de IgM a nível intratecal (Lejon *et al.*, 2002). Devido ao empenho da comunidade internacional e algumas organizações como a OMS, leva-se a querer que novos meios de diagnóstico mais sensíveis e específicos sejam desenvolvidos nos próximos anos.

A quimioterapia actual da THA é baseada nas drogas nomeadas suramina, pentamidina, melarsoprol e eflornitina. O nifurtimox encontra-se sob avaliação experimental e a nova droga designada DB 289, um derivado da dimidina encontra-se também em estudo (Barrett *et al.*, 2003). O primeiro registo terapêutico de quase todas as quatro drogas usadas encontra-se na primeira metade do século XX e desde 1981 que não há novos fármacos credenciadas para o tratamento desta doença. A fase hemolinfática da THA é tratada com suramina *i.v.* no caso *rhodesiense* e com pentamidina *i.m.* na doença provocada por *gambiense*. O melarsoprol *i.v.* é a única droga eficaz para o tratamento da fase cerebral das duas formas da doença, por atravessar a barreira hemato-encefálica (Chin, 2000). Podem constituir alternativas terapêuticas de segunda linha, para tratamento da fase tardia, o nifurtimox oral, para *rhodesiense* e a eflornitina, para *gambiense*. Este último composto é demasiado caro para tratamentos de rotina mas com efeitos secundários menos marcados que o melarsoprol (Fèvre *et al.*, 2008). Estão ainda registados esquemas terapêuticos de melarsoprol de curta duração e uma combinação desta droga com suramina bem como estudos de associação entre a eflornitina e o nifurtimox, com sucesso terapêutico assinalável no modelo animal (Bachi, 2009).

O grande problema das terapêuticas actualmente aprovadas para a THA prende-se com sérias reacções adversas aos tratamentos devidas à toxicidade, recidivas e necessidade de longos períodos de quimioterapia. Surgem muitas vezes reacções como cefaleias, prurido, polineuropatias, dermatite exfoliativa, febre, diarreia, erupções macropapulares dores abdominais e torácicas (Fèvre *et al.*, 2008). A encefalopatia é considerada o mais grave dos efeitos adversos e que pode ocorrer em até 18% dos doentes tratados (Kasper *et al.*, 2005) e desses, entre 3 e 10% acabam por sucumbir (OMS, 2001). A

resistência por parte do protozoário às drogas usadas para o combate à THA está aparentemente a aumentar: falhas no tratamento com melarsoprol do estágio tardio de *rhodesiense* estão a atingir níveis críticos. Impõe-se urgência na procura de medicamentos mais seguros, principalmente porque a toxicidade dos que já existem vai além do que está regulado em termos dos padrões farmacológicos internacionais (Baral, 2009).

1.5 - Biologia do *Trypanosoma brucei*

Taxonomicamente a espécie *T. brucei* é um protista, pertencente ao género *Trypanosoma*. Inclui-se na secção *Salivaria* e subgénero *Trypanozoon* como já foi referido. Esta espécie divide-se em três subespécies distintas, causando duas delas a THA: *Trypanosoma brucei rhodesiense*, a forma aguda da doença, e *Trypanosoma brucei gambiense*, forma crónica da doença do sono. Animais infectados, gado ou silváticos, são os reservatórios dos parasitas causadores da doença humana (Kennedy, 2004) e a transmissão natural de ambos os tipos patogénicos de tripanossoma, na mesma área geográfica, acontece apenas no Uganda (Fèvre *et al.*, 2006). Como forma de existir uma classificação cada vez mais rigorosa, ao longo dos anos, os resultados de estudos moleculares têm clarificado as diferenças entre as subespécies. A forma *T.b. gambiense*, ainda que morfológicamente não o seja, é geneticamente distinta do *T.b. rhodesiense*, podendo numa linha evolutiva serem consideradas variações locais de *T.b. brucei* (Barret *et al.*, 2003). Esta última subespécie é lisada naturalmente pelo soro humano (Njiru *et al.*, 2004).

Os *Kinetoplastida* são seres eucariotas exibindo algumas estruturas convencionais donde se inclui o núcleo delimitado por uma membrana, para além de variados organelos (McKane e Kandel, 1996) como os retículos endoplasmáticos liso e rugoso, complexo de Golgi e uma mitocôndria única de grandes dimensões. Os tripanossomatídeos apresentam um raro ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *desoxiribonucleic acid*) mitocondrial, que se encontra condensado numa estrutura designada de cinetoplasto (Fairlamb *et al.*, 1978), agrupado numa rede circular com duas formas. A primeira, os maxicírculos, codificam ácido ribonucleico (RNA, do inglês, *ribonucleic acid*) ribossomal e algumas proteínas da mitocôndria, contudo necessitam ser descriptados e

editados para formarem RNA mensageiro (mRNA) funcional. Este processo de edição, exclusivo destes parasitas, é controlado pelo RNA guia, codificado nos minicírculos, a segunda forma de agrupamento do DNA no cinetoplasto (ILRAD, 1979). Os constituintes do kDNA (do inglês *kinetoplast DNA*) podem ser válidos como novos alvos em termos terapêuticos (Barrett *et al.*, 2003).

Um dos aspectos dignos de menção relacionados com o parasita é a alteração da forma de obtenção de energia consoante se encontre no hospedeiro mamífero ou no vector hematófago. Nas formas sanguíneas, pelo ambiente rico em glicose, as moléculas de adenosina trifosfato (ATP) são conseguidas pelo processo de glicólise exclusivamente a nível de estruturas especializadas, os glicossomas. Nesses organelos pensa-se que exista um complexo multienzimático com características diferentes das enzimas glicolíticas de outros eucariotas, pelo que podem constituir também possíveis alvos terapêuticos (Atouguia, 2005). Na mosca, a glicólise dá-se na mitocôndria onde se realiza um ciclo de Krebs relativamente convencional, com a fosforilação oxidativa das prociclinas a acontecer nessa estrutura celular (Mathews *et al.*, 2004).

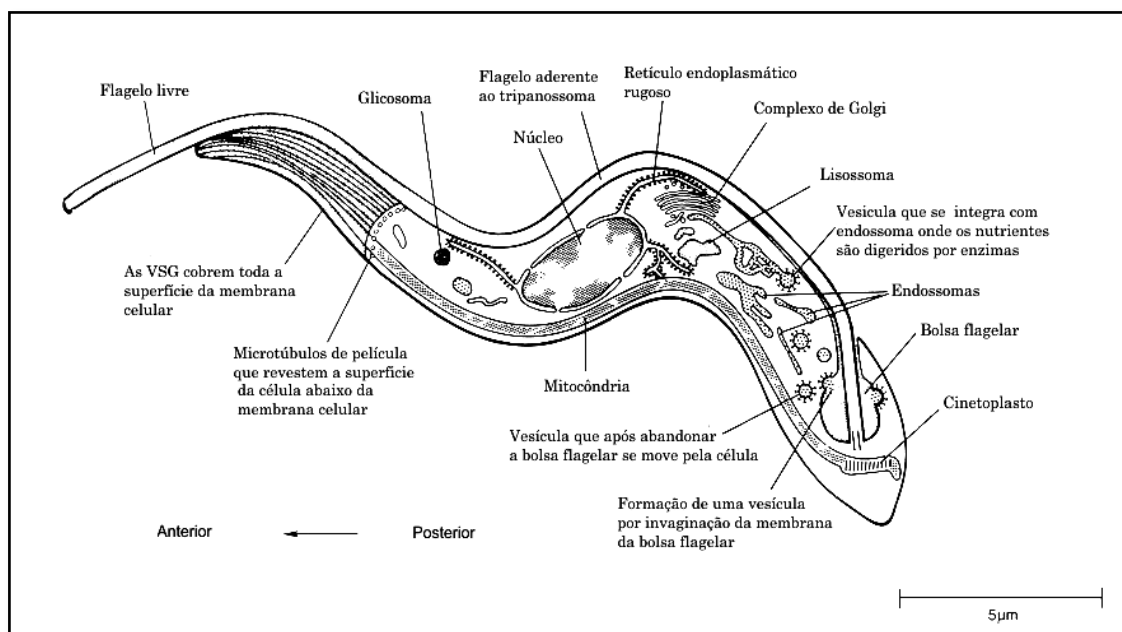


Figura 1.2 - Morfologia da forma tripomastigota do tripanossoma. É caracterizada pelo núcleo central e pelo cinetoplasto posterior. São visíveis diversas estruturas como a bolsa flagelar donde se crê terem origem os processo de endocitose e exocitose, a mitocôndria transversal a todo o corpo do parasita e o flagelo com inserção posterior no corpo do protozoário.

FONTE: Adaptado de <http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/fulldocs/Ilrad90/Trypano.htm>

No núcleo do *T. brucei*, o DNA encontrado pode agrupar-se em três classes, dependendo do tamanho dos seus cromossomas. Os maiores, com 11 pares de cromossomas de uma a seis megabases contêm os genes de manutenção da célula e representam quase 80% do DNA contido no núcleo. Existem zonas subteloméricas contendo um arquivo de 806 genes ou pseudogenes para as glicoproteínas variáveis de superfície (VSG, do inglês *variable surface glycoprotein*) usados para a evasão ao sistema imunitário por parte do parasita. Apresentam também os cromossomas intermédios com tamanhos entre os 200 e os 900 kb e inúmeros minicromossomas de 50 a 150 kb, que contêm aproximadamente 10 % do DNA do núcleo (Berriman *et al.*, 2005).

Os tripanossomas possuem um único flagelo que acompanha o corpo do parasita na quase totalidade da sua extensão, excepto na sua extremidade (McKane e Kandel, 1996) e tem como função primordial o movimento do parasita. Ao contrário de outras células, o flagelo precede a célula na locomoção originando-se o movimento ondulatório na extremidade livre da estrutura e não na base, como é convencional noutras células. O flagelo permite também a adesão do parasita aos tecidos do hospedeiro, sendo parte importante na morfogénese e divisão celular (Baral, 2009). A estrutura donde o flagelo abandona o citoplasma tem a designação de bolsa flagelar e é uma invaginação da membrana plasmática altamente diferenciada. Parece ser o único local da célula onde se dão os processos de endocitose e exocitose permitindo a internalização de macromoléculas do hospedeiro enquanto restringe o acesso do sistema imunitário aos receptores endocíticos do tripanossoma, que aí se encontram expostos (Field e Carrington, 2009).

A relação de parasitismo estabelecida entre o *T. brucei* e o hospedeiro possui características complexas e ainda com lacunas científicas do seu funcionamento. É o caso do uso de quimiocinas e citocinas do mamífero, por parte do tripanossoma, como factores de crescimento (Hamadien *et al.*, 1999). Mais especificamente, o IFN- γ produzido pelas células T CD8⁺, além de induzir à libertação de TNF- α pelos macrófagos, é usado em proveito próprio pelo parasita que estimula as células T citotóxicas à sua produção através do factor TLTF (do inglês, *T lymphocyte triggering factor*) (Hamadien *et al.*, 1999). As células linfocitárias estimuladas vão ainda secretar o factor de crescimento TGF- β (do inglês, *transforming growing factor beta*), molécula interveniente na imunossupressão, pela inibição da secreção das interleucinas IL-4 e IL-6, citocinas impor-

tantes na proliferação e diferenciação das células B (Fargeas *et al.*, 1992). O factor de crescimento epidérmico (EGF, do *inglês* *epidermic growing factor*) quando ligado aos receptores do *T.b. brucei* favorece também o seu crescimento (Hide *et al.*, 1989). A passagem dos macrófagos de uma activação clássica para uma activação alternativa origina a diminuição de factores tripanocidas em circulação e aumenta a produção de L-ornitina (Gobert *et al.*, 2000). Esta molécula é necessária à síntese de compostos vitais ao processo de biossíntese de macromoléculas no parasita, as poliamidas, como é o caso do tripanotio (Vincendeau *et al.*, 2003), um derivado do glutatião, molécula com a possível característica de conferir resistência ao parasita contra os efeitos tóxicos dos peróxidos (Atougua, 2005).

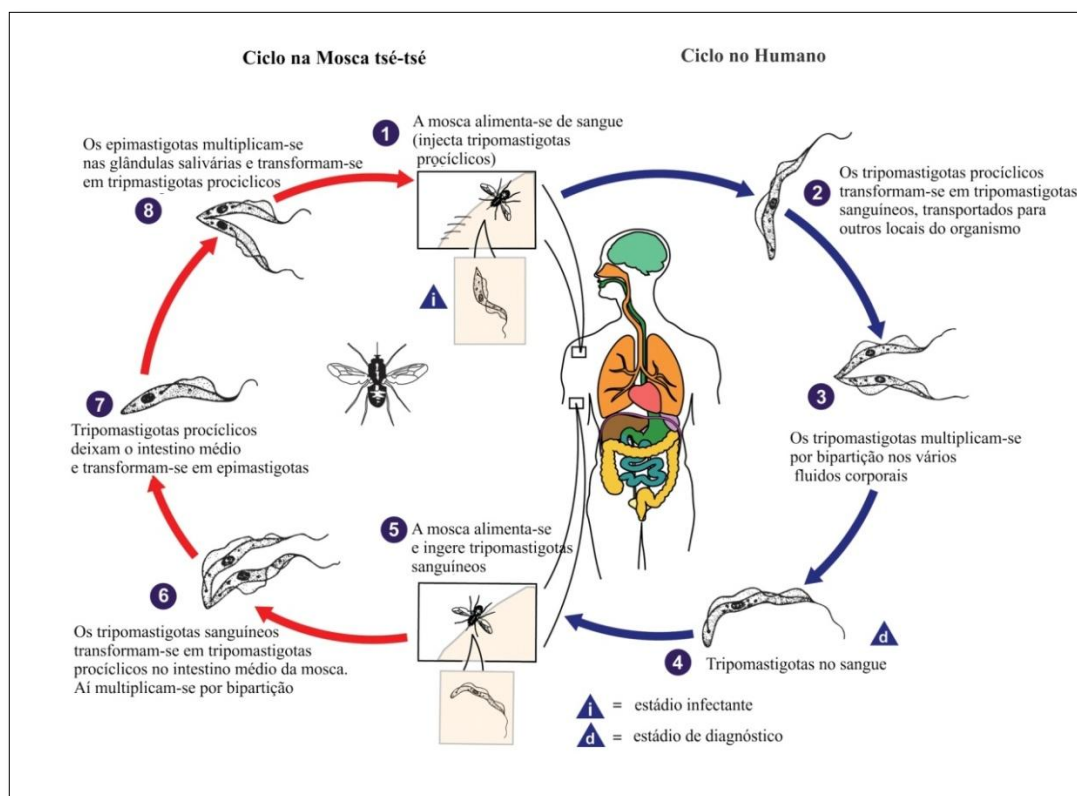


Figura 1.3 - Ciclo de Vida dos tripanossomas Africanos. Envolve os insectos vectores que propagam, enquanto se alimentam, os tripanossomas ao hospedeiro mamífero. Da mesma forma uma mosca não infectada ao ingerir sangue de um hospedeiro infectado pode assimilar as formas existentes na corrente sanguínea previamente adaptadas a continuar o ciclo de vida na glossina. Completa-se assim o desenvolvimento e perpetua-se a propagação da infecção.

FONTE: Adaptado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAfrican.htm>

Os tripanossomas africanos são transmitidos entre os hospedeiros mamíferos pelas moscas do género *Glossina spp*, são considerados parasitas exclusivamente extrace-

lulares, multiplicando-se por bipartição ao longo de todo o seu ciclo de vida (Chappuis *et al.*, 2005). Uma vez em contacto com os fluidos do hospedeiro, os parasitas são sujeitos a alterações na sua divisão, proliferação e morfologia, estando cada um destes aspectos determinado com elevada precisão (Matthews, 1999). Conforme esquematiza a figura 1.3, as moscas ingerem tripanossomas ao fazer uma refeição de sangue de um animal infectado (Cook e Zumla, 2003). Esses parasitas vão então sofrer alterações metabólicas e originar tripomastigotas procíclicos proliferativos, por bipartição no intestino médio da mosca, perdendo as VSG características da corrente sanguínea (Cross, 1975). Com o ganho das prociclinas (Mowatt e Clayton, 1987) ou proteínas procíclicas acídicas repetitivas (PARP, do inglês *procyclic acidic repetitive proteins*) iniciam-se alterações morfológicas como a deslocação do cinetoplasto de uma posição central para a porção mais posterior da célula. Este organelo revela-se fundamental para a diferenciação, pois formas discinetoplastidas, sem cinetoplasto ou com cinetoplasto incompetente, não conseguem terminar o referido processo (Matthews *et al.*, 2004).

Um dos aspectos característicos do ciclo de vida do *T. brucei* é a rápida libertação das VSG ancoradas via GPI, crê-se que em parte por uma fosfolipase C (PLC, do inglês *phospholipase C*) específica (Magez *et al.*, 2002b, Subramanya *et al.* 2010) aquando da diferenciação das formas não replicativas sanguíneas, para formas que expressam prociclinas (Bulow *et al.*, 1989). Esta mudança é fundamental e necessária ao parasita quando entra no vector. Mas, aparentemente a GPI-PLC parece não ser essencial para a substituição das VSG, contudo a sua ausência está associada a diminuição da parasitemia e aumento da sobrevivência no modelo experimental (Webb *et al.*, 1997). Tal permite atribuir à GPI-PLC mais uma hipotética função de virulência que de clivagem proteica das VSG (Gruszinski *et al.*, 2006). Um segundo mecanismo envolvido na libertação de VSG é através da clivagem proteolítica via metaloproteínases dependentes de zinco, por exemplo, MSP-B (Grandgenett *et al.*, 2007) cujas características constituem tema a ser desenvolvido posteriormente. O péptido resultante dessa clivagem pode servir de sinalização, quer para a mosca quer para o parasita, como modelador do curso da infecção (Matthews *et al.*, 2004).

Os tripomastigotas migram então para as glândulas salivares da mosca tsé-tsé, onde desenvolvem a membrana flagelar através da qual aderem à superfície da glândula onde se multiplicam, maturam e alteram a sua configuração de epimastigotas para tri-

pomastigotas metacíclicos (Cook e Zumla, 2003). Depois de libertados para o lúmen da glândula salivar não prosseguem a diferenciação, até serem injectados no mamífero. Este processo demora na mosca aproximadamente 21 dias no fim do qual o insecto fica infectante (Kennedy, 2004) e por mecanismos não compreendidos o ciclo só é completa em cerca de 1% das glossinas (Cook e Zumla, 2003). Se a mosca ingerir mais do que uma estirpe de tripanossomas africanos existe a possibilidade de troca de material genético entre elas (Sternberg e Tait, 1990), no entanto é controversa a existência de um estágio sexual no desenvolvimento destes parasitas. Ao fazer uma nova refeição são injectadas, via intradérmica, as formas metacíclicas que se diferenciam em tripomastigotas, formas alongadas e replicativas por fissão binária, primeiro no sistema linfático e depois atingindo a corrente sanguínea para chegar às várias partes do organismo do mamífero (Kennedy, 2004). As prociclinas são substituídas, ao fim de aproximadamente sete dias, por um repertório mais alargado de moléculas que revestem todo o corpo do parasita, as VSG (Donelson, 2002). Estabelecida a infecção e durante a ascensão do número de parasitas no sangue, encontram-se em circulação as formas alongadas (*slender*) e proliferativas. Ao atingir-se o pico da parasitémia, as formas curtas, achatadas (*stumpy*) e não proliferativas são as mais encontradas (Matthews *et al.*, 2004) como está representado

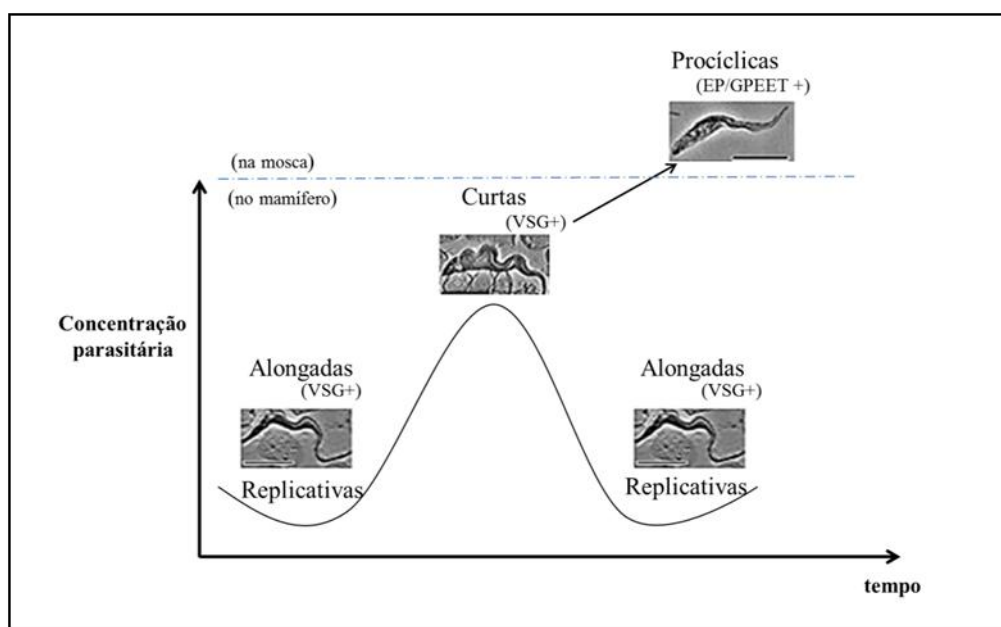


Figura 1.4 -Variação das formas de tripanossomas durante a parasitémia ondulante. A replicação das formas alongadas (*slender*) cessa no pico da parasitémia. Aí dá-se a diferenciação da maioria dos tripanossomas para formas achatadas e curtas (*stumpy*) pré adaptadas a continuar o ciclo na mosca. FONTE: Adaptado de Matthews *et al.* (2004).

na figura 1.4. A transição entre os extremos *slender* e *stumpy* pode ficar a dever-se à acumulação de uma substância libertada pelos parasitas que vai influenciar o referido processo, o factor indutor das formas curtas (SIF, do inglês *stumpy induction factor*), de massa inferior a 500 Da (Vickerman, 1997). Tais alterações envolvem a progressão desde a proliferação até um ciclo celular incompleto, acompanhado por alterações biológicas e morfológicas. Os tripanossomas *stumpy* encontram-se pré-adaptados para a transição para formas procíclicas, caso atinjam o intestino médio da mosca e prosseguir o ciclo (Chappuis *et al.*, 2005).

Estima-se que aproximadamente 10^7 VSG revistam a superfície de cada um dos tripanossomas, ancoradas à membrana por moléculas de GPI (do inglês, *glycosyl-phosphatidyl-isonitol*) formando uma camada homogénea e densa (Magez *et al.*, 2002b). A função desta camada impermeável a algumas macromoléculas, como as imunoglobulinas, é proteger os constituintes invariáveis da membrana exterior dos ataques do sistema imunitário (Vickerman, 1997). A forma como o *T. brucei* se evade às células de defesa do hospedeiro permanece ainda, em grande parte, um desafio para a comunidade científica (Cook e Zumla, 2003). Esse sistema de escape requer um enorme reservatório genético podendo consumir de 10 a 30% do genoma do *T. brucei*, o que se traduz de aproximadamente 100 (no genótipo do *T.b. gambiense*) a cerca de 1000 genes para VSG ou pseudo VSG para o *T.b. rhodesiense* (Cook e Zumla, 2003). Todos esses genes estão transcricionalmente silenciosos excepto um, sendo a VSG activa possivelmente translocada para um de 20 possíveis locais de expressão nas formas sanguíneas (B-ES, do inglês *bloodstream expression sites*) e outros prováveis 20 locais metacíclicos (M-ES, do inglês *metacyclic expression sites*) nas formas encontradas na mosca, o que perfaz um total de cerca de 40 locais de expressão codificados no DNA tripanossomal. Pensa-se que esses locais de transcrição se encontram situados num corpo extranucleolar onde reside a RNA polimerase I que irá sintetizar a VSG (Donelson, 2002).

Pode ser necessária ao parasita a substituição da sua camada de VSG em várias ocasiões (Webb *et al.*, 1997). A primeira ocorre até sete dias após a entrada no hospedeiro mamífero quando todas as células substituem as VSG metacíclicas, por VSG das formas sanguíneas. A segunda ocasião deve-se à variação genética em tripanossomas individuais, numa pequena percentagem da população, que expressam dessa forma VSG

diferentes. Neste caso a substituição das VSG deve demorar várias gerações e não são reconhecidas como antígeno pelo sistema imunitário, que só identifica VSG na forma que reveste a maioria dos parasitas, isto é do VAT (do inglês, *variable antigenic type*) dominante. A terceira situação em que é necessária a substituição das VSG advém da diferenciação das formas curtas e achatadas para tripanossomas procíclicos que ocorre na mosca e leva à implementação das prociclinas (Cook e Zulma, 2003).

A proliferação de tripanossomas exibindo VSG para as quais não há ainda anti-corpos em circulação faz com que o parasita esteja sempre “um passo à frente” das defesas do hospedeiro (Donelson, 2002). Tal aspecto causa uma parasitemia ondulante como mostra a figura 1.5 causa da eliminação dos protozoários com VSG reconhecidas e que revestem a maioria dos parasitas, ou seja, o VAT dominante. Porque não são identificados inicialmente pelo sistema imunitário, o aumento concomitante do número dos que apresentam uma VSG diferente da maioria transforma uma célula inicial no próximo VAT dominante, até nova eliminação e repetição do processo (Atouguia, 2005).

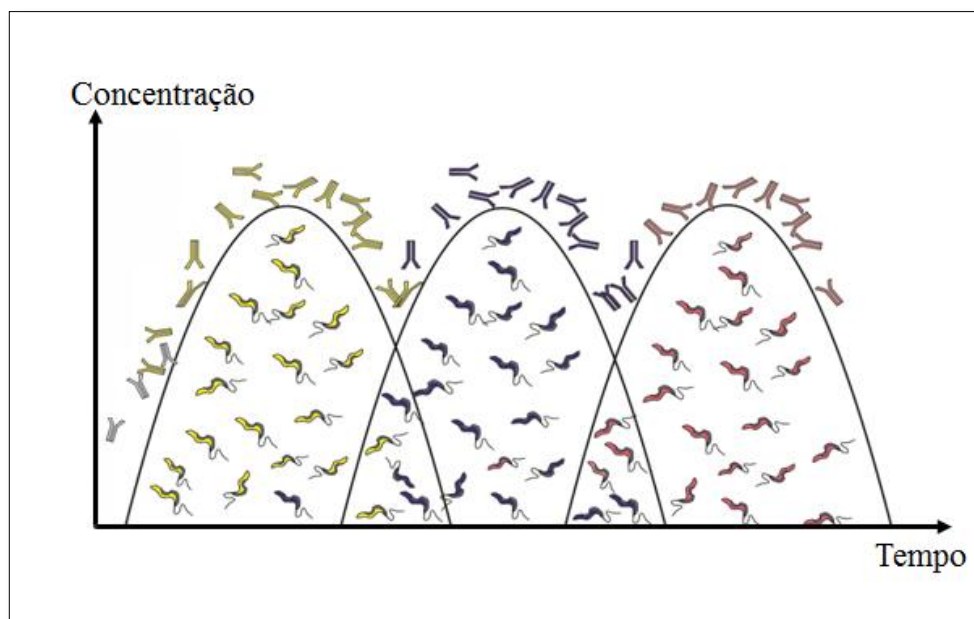


Figura 1.5- As sucessivas ondas de parasitemia e a resposta humoral ao VAT dominante. A eliminação dos parasitas de um VAT específico reconhecido pelo sistema imunitário dá lugar à proliferação de outro que se multiplica, enquanto as novas VSG não forem reconhecidas pelo sistema de defesa do hospedeiro. Esta cíclica multiplicação de uma minoria que não é identificada pelo sistema imune perpetua a infecção. FONTE: Adaptado de Atouguia, J. (2005). *Tripanossomose Humana Africana*. Lisboa : Universidade Aberta, p. 30.

Existem vários genes associados aos locais de expressão das VSG, os ESAG (do inglês, *expression site associated genes*) sugerindo com os seus rearranjos e mutações que os B-ES são mais dinâmicos e menos estáveis que os M-BS, que não os apresentam (Leonardo *et al.*, 1986). Apesar de serem desconhecidas as proteínas codificadas por alguns ESAG, existem outras já identificadas e que são importantes para o tripanossoma. Um desses ESAG é o gene SRA codificador de uma proteína que confere resistência à lise do *T.b. rhodesiense* pelo soro humano (Barrett *et al.*, 2003). A transferência deste gene para *T.b. brucei* não resistente confere-lhe resistência. Outros genes importantes são o ESAG 6 e ESAG 7 responsáveis pela formação de um receptor de transferrina, proteína que se liga ao ferro sanguíneo para ser captado dessa maneira pelos tripanossomas (Donelson, 2002).

1.6 - Interação entre sistema imunitário e *Trypanosoma brucei*

Ao longo da co-evolução com o hospedeiro mamífero, os tripanossomas aprenderam a “iludir” o sistema imunitário alterando os numerosos passos que levam a uma resposta eficaz. Os seres humanos e outros primatas possuem uma resistência natural contra a subespécie *T.b. brucei* através de factores tripanolíticos (Njiru *et al.*, 2004), contudo não são eficazes contra as formas *rhodesiense* e *gambiense* que causam a THA. Enquanto as formas sanguíneas são eliminadas durante a infecção, o sistema imunitário é continuamente “bombardeado” com quantidades massivas de antígenos invariáveis e VSG, o que leva à formação de anticorpos específicos. A detecção de todos os tripanossomas torna-se difícil uma vez que as proteínas invariáveis se encontram inacessíveis dentro dos parasitas vivos e as VSG, proteínas acessíveis, mudam periodicamente (Donelson *et al.*, 1998).

Num primeiro momento, diferentes células do hospedeiro são activadas por vários factores do tripanossoma iniciando o processo inflamatório. O DNA libertado dos parasitas entretanto eliminados parece ser o factor responsável pela activação dos macrófagos, causando a secreção de várias moléculas pró-inflamatórias (Tipo I) como o TNF-

- α , IL-1 e IL-6 e óxido nítrico (Namangala *et al.*, 2009). Os macrófagos activados podem eliminar parasitas opsonizados pelos anticorpos além de libertar substâncias tóxicas para o controlo do primeiro pico de parasitémia, por exemplo NO e TNF- α (Sternberg e Mabbott, 1996). A activação dos macrófagos e a consequente libertação de NO crê-se ser devida à estimulação das células Th1, onde as citocinas sintetizadas parecem ser fundamentais na resposta ao tripanossoma. Pensa-se que exista uma sinergia entre macrófagos e células T resultando na produção de IFN- γ e na estimulação excessiva da activação dos macrófagos bem como na produção de TNF- α . Tal processo tem um papel hipoteticamente contraditório na indução da patologia e no controlo da parasitémia (Askonas e Bancroft, 1984). Esta hiperestimulação de fagócitos pode resultar em benefício do parasita através da produção de IFN- γ , um factor de crescimento para o parasita (Vincendeau e Bouteille, 2005)

Com o decorrer da infecção, a inflamação primária necessita ser contida por existir risco de efeitos prejudiciais ao organismo. Tal é conseguido pela inibição dos macrófagos e libertação de citocinas anti-inflamatórias (Tipo II) como IL-4, IL-10 e IL-13 (Namangala *et al.*, 2009), que estão associadas a uma maior sobrevida do hospedeiro. Uma resposta do tipo I é desenvolvida durante a fase hemolinfática e pretende o controlo do parasita mas, ao atingir-se a fase tardia do curso da doença, surge uma resposta tipo II como tentativa do organismo controlar a patologia (Baral, 2009).

Pela infecção experimental crê-se que a transição da primeira para a segunda fase da doença esteja dependente da secreção de citocinas tipo II pelos macrófagos e células microgliais. Estas citocinas, por sua vez, activam as metaloproteinases da matriz celular a clivar componentes da membrana basal das células endoteliais da BHE, o que pode facilitar a migração dos leucócitos e tripanossomas para o sistema nervoso central, situação experimentalmente reduzida através de quimioterapia (Masocha *et al.*, 2006). Não obstante, o papel individual de cada citocina permanece todavia confuso e até antagónico: por exemplo, a produção de IL-4 regulada por células T CD4⁺ parece ter sido crucial para o controlo do *T.b. gambiense* em ratos (Inoue *et al.*, 1999), enquanto outros não obtiveram alteração no decurso da infecção em animais privados da expressão desta citocina (Hertz *et al.*, 1998). Por sua vez o TNF- α parece desempenhar um papel no controlo da infecção e no desenvolvimento da patologia pelo controlo da parasitémia e indução da caquexia (Magez *et al.*, 1999).

No que diz respeito à formação de uma resposta humoral, a tripanossomose no modelo murino é caracterizada por uma activação de células B policlonais, traduzida no aumento do seu número na corrente sanguínea assim como das imunoglobulinas plasmáticas, principalmente IgM. Como resultado, apesar de serem produzidos anticorpos específicos, existem outros hetero-específicos podendo actuar inclusivamente como auto-anticorpos (Vincendeau e Bouteille, 2005). Os anticorpos específicos anti-VSG mediam a destruição e *clearance* dos parasitas nas sucessivas ondas parasitárias, contribuindo para um estado de tripanotolerância. Encontra-se ainda documentado que a imunização com fragmentos de VSG protege o modelo murino contra os parasitas que no seu conjunto apresentam o mesmo VAT. Os complexos imunes resultantes da ligação VSG - anticorpo específico são eficazmente eliminados através das células de Kupffer no fígado (Shi *et al.*, 2004).

Com a progressão da infecção, as células B são suprimidas resultando na ausência de resposta de IgG e no decréscimo da produção de IgM. A supressão das funções quer das células B e T quer dos macrófagos é um factor importante para o desenvolvimento de doenças oportunistas (Taylor, 1998). A incompetência progressiva do sistema imune deve-se à inibição da proliferação das células T pela baixa na produção da IL-2 e expressão do seu receptor (Sileghem *et al.*, 1989). As prostaglandinas e o NO impedem a proliferação das células T no baço, peritoneu e nódulos linfáticos em ratos infectados com este parasita durante a fase inicial da doença. Nesta altura o envolvimento de TNF- α e IFN- γ na inibição das células T parece estar relacionado com o aumento da produção de prostaglandinas e NO (Scheilfer e Mansfield, 1993). O TNF- α estimula o desenvolvimento de células supressoras pela indução da produção de IFN- γ ao nível do nódu-lo linfático do rato infectado com *T. brucei* (Darji *et al.*, 1996). Na fase tardia, a inibição da proliferação das células T a nível do timo faz-se por uma via independente do NO e prostaglandinas em que o IFN- γ libertado pelas T CD8⁺ é fundamental (Darji *et al.*, 1993). A produção de IL-10 pelos macrófagos dos ratos infectados diminui a apresentação de antígeno e o consequente número de células T que são activadas (Ding *et al.*, 1993).

1.7 - Biologia e fisiologia das Metaloproteinases

As metaloproteinases (MMP) pertencem a uma família de cerca de 25 endopeptidases dependentes da presença de um átomo de zinco no centro activo para a sua actividade: a degradação da matriz extra celular (MEC). Essa matriz é uma rede extracelular composta por elementos funcionais especializados como o colagénio, laminina, proteoglicanos e glucosaminoglicanos (Acharya *et al.*, 2004). A degradação da MEC pelas MMP é um aspecto importante quer em condições biológicas normais ou de doença (Woessner, 1991). São classificadas de acordo com o seu domínio e organização estrutural, além dos substratos específicos que degradam, apresentando diversas classes (Visse e Nagase, 2003). As MMP A e B (MMP-2 e -9 respectivamente) também designadas gelatinases degradam entre outros, o colagénio desnaturado (gelatinas) e as collagenases 1, 2 e 3 (MMP-1, -8 e -13, respectivamente) actuam sobre o colagénio intersticial. As estromelisinases 1 e 2 (MMP-3 e -10) degradam fibrinectina e proteoglicano e as matrilisinases 1 e 2 (MMP-7 e -26) degradam fibrinectina e colagénio. As MMP ligadas à membrana celular (MT-MMP) servem de substrato a outras MMP e também elas degradam componentes específicos da matriz (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993).

Do conhecimento que se tem actualmente, no seu conjunto as MMP degradam todos os constituintes conhecidos da MEC se bem que as suas acções são, até à data, mais presuntivas que comprovadas (Parks, 1999). As metaloproteinases são enzimas sintetizadas no tecido conjuntivo e secretadas, à luz do conhecimento actual, de uma forma intermitente pelas células estromais como zimogénios inactivos. A expressão génica das MMP parece ser regulada por sinais exógenos como citocinas ou factores de crescimento e a regulação das metaloproteinases, após activação, é um processo complexo que envolve uma rede de cascatas de activação onde uma MMP pode actuar como substrato para outra (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). A maioria das MMP têm substratos múltiplos o que ajuda em parte a regular a sua expressão e os reguladores teciduais endógenos específicos destas enzimas, os TIMP (do inglês, *tissue inhibitors of metalloproteinases*). Essas moléculas desempenham um papel no controlo das MMP por diferentes mecanismos de activação e inibição, em conjunto com inibidores inespecíficos como é o caso

das α 2-macroglobulinas (Cawtson, 1995). Acredita-se que a desregulação no sistema MMP-TIMP pode causar patologias como alterações autoimunes cutâneas, artrite reumatóide, úlceras crônicas, cicatrização e metastização tumoral entre outros (Bode *et al.*, 1998). Estas enzimas podem contribuir também para uma exacerbação do processo inflamatório pela activação da interleucina β (IL- β) com acção pro-inflamatória ou libertação de TNF- α e IL-6 da superfície celular. Os fragmentos proteicos resultantes da degradação da MEC podem também levar à activação de mais células inflamatórias (Acharya, 2004).

Em patologias, como a meningite pneumocócica, existe uma produção de MMP-9 que pode contribuir para a degradação da barreira hematoencefálica e consequente dano neuronal. As micobactérias como *Mycobacterium leprae*, por sua vez, produzem elevadas quantidades de mRNA para MMP-2 e -9 tanto *in vivo* como *in vitro* o que corrobora o eventual papel destas enzimas durante o processo de infecção e inflamação (Teles *et al.*, 2009). Em ratos com isquémia cerebral induzida, a produção de ambas as gelatinases diminuiu após tratamento com doxiciclina e levou à consequente melhoria do estado dos animais (Burgraff *et al.*, 2006).

Pensa-se que na infecção com *T. brucei* a invasão do sistema nervoso central através da BHE se dê de uma forma semelhante à passagem dos leucócitos. A presença de tripanossomas no parênquima cerebral leva à migração leucocitária de neutrófilos, linfócitos B, linfócitos T e monócitos aos vasos sanguíneos do cérebro. Esse afluxo leva a um processo inflamatório e ao aumento da entrada de proteínas plasmáticas no LCR (Masocha *et al.*, 2007). Estima-se que este aumento da permeabilidade possa favorecer a passagem, principalmente no plexo cricóide, dos parasitas. Também o tratamento com minociclina de murganhos infectados com *T. brucei* levou à diminuição da expressão, para além de citocinas e quimiocinas, das MMPs -3, -8 e -12 diminuindo o envolvimento cerebral da infecção (Masocha *et al.*, 2006).

Relacionada com a entrada e sobrevivência dos protozoários *Leishmania* no macrófago está a secreção, pelos parasitas, de uma metaloproteinase dependente de zinco: a protease major de superfície (L-MSP, GP63, ou leishmanisina) (Yao *et al.*, 2003). Evolutivamente relacionado com o género *Leishmania*, o *T. brucei* apresenta também expressão de metaloproteinases pois conseguiu-se experimentalmente um efeito tripanocida através do efeito peptidomimético com inibidor sintético da GP63 (Bangs *et al.*,

2001). Tal situação sugere que a expressão de pelo menos um homólogo da L-MSP é essencial para a sobrevivência do *T. brucei* na corrente sanguínea do hospedeiro. LaCount e colaboradores (2003) demonstraram que a proteína major de superfície B de *Trypanosoma brucei* (TbMSP-B) foi eficaz na clivagem de uma VSG recombinante em células procíclicas transgênicas. Outro aspecto importante documentado é que a inibição da transcrição e tradução dos genes para TbMSP-B permite uma diferenciação incompleta de células *stumpy*, sanguíneas, para procíclicas (Gruszyński *et al.*, 2006). Em conjunto, os trabalhos de LaCount e Gruszyński levam à formulação da hipótese de que pode ser a TbMSP-B a metaloproteinase, de importância vital, envolvida na diferenciação das formas sanguíneas do mamífero para aquelas encontradas na mosca. Esta suposição vai de encontro a Ziegelbauer *et al.* (1993) que revela, por meio de cultura *in vitro*, duas estruturas de VSG após a diferenciação celular entre as formas *slender* e *stumpy*: uma proteína VSG clivada pela GPI-PLC e outra, VSG de forma truncada, libertada por ação de uma metaloproteinase. Quando silenciados todos os alelos para GPI-PLC e para TbMSP-B no tripanossoma, não se produziu a substituição de aproximadamente 60% das VSG por prociclinas. Suprimiu-se ainda o normal ciclo que permite ao parasita infectar o intestino médio da mosca (Grandgenett *et al.*, 2007).

Os genes do *T. brucei* que codificam proteases idênticas à leishmanisina podem ser agrupados em três famílias, com estruturas proteicas altamente conservadas: as proteases major de superfície A, B e C, não havendo ainda informação rigorosa acerca das suas características. O critério mais revelante de agrupamento é a sua expressão diferencial ao longo do ciclo de vida do tripanossoma. As formas encontradas na corrente sanguínea exibem mRNA para a formação de todas as MSP enquanto as formas procíclicas só apresentam mRNA para a TbMSP - B. Na mosca, algumas VSG podem ser pontualmente transcritas assim como genes associados aos locais de expressão das VSG, os ESAG. Por isso a presença da MSP-B nas formas procíclicas poderá ter a função de evitar a acumulação, na superfície celular, de proteínas desnecessárias nesse estágio de desenvolvimento (LaCount *et al.*, 2003). Cabe à prociclina EP, antigénio composto por repetições internas de ácido glutâmico (E) e prolina (P) e à prociclina GPEET, antigénio composto por repetições de glicina (G), prolina (P), ácido glutâmico (E) e treonina (T) a função de revestimento, via GPI, das formas que se encontram no vector (revisto por Roditi *et al.*, 1998).

Mais recentemente, de Sousa e colaboradores (2010) caracterizaram parcialmente uma MMP de massa molecular aproximada a 40 kDa, em extracto de *T.b.brucei*. Esta metaloproteinase, com marcada acção sobre os substratos gelatina e caseína, teve a sua actividade restringida através de inibidores clássicos das MMP, como o EDTA, ou de fármacos adstritos ao grupo das tetraciclinas, porventura revelando um novo alvo terapêutico contra este protozoário.

1.8 - Tetraciclinas

Dentre os diferentes grupos de anti-microbianos disponíveis, as tetraciclinas são antibióticos bacteriostáticos de largo espectro cuja utilidade terapêutica tem vindo a diminuir como consequência do desenvolvimento de resistências. Permanecem contudo fármacos de eleição nas infecções causadas por *Chlamydia*, *Rickettsia*, *Brucella* e *Borrelia burgdorferi* (doença de Lyme) e o seu mecanismo de acção está bem estabelecido. Ligando-se ao local “A” da subunidade 30S do ribossoma, as tetraciclinas inibem a síntese proteica pois impedem a ligação de aminoacil-tRNA e a consequente adição de novos aminoácidos à cadeia polipéptica (Brunton *et al*, 2008).

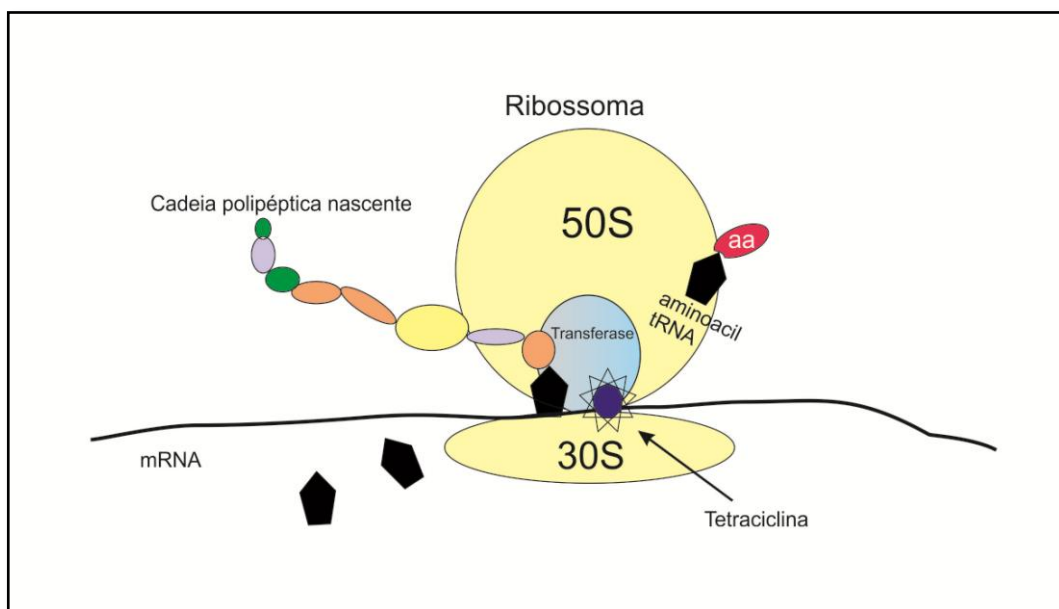


Figura 1.6 - Acção das tetraciclinas. Ligando-se ao local A da subunidade 30S do ribossoma bacteriano, as tetraciclinas não permitem o continuar da formação da cadeia péptica, impedindo a adição de novos aminoácidos (aa). FONTE: Adaptado de Brunton, L. L., Parker, K. L., Blumenthal, D. K., & Buxton, I. L. (2008). *Goodman & Gilman's Manual of Pharmacology and therapeutics*. San Diego: McGraw-Hill; p. 763

Dado o seu perfil de reacções adversas e características farmacocinéticas, a doxiciclina é considerada a tetraciclina de eleição (Infarmed, 2004) e os seus efeitos estão também relacionados com a prevenção da ruptura do tecido conjuntivo por múltiplos mecanismos não antimicrobianos, como a capacidade de serem potentes inibidores das MMP (Golub *et al.*, 1998).

As tetraciclinas exercem actividade anti-inflamatória pela inibição da quimiota-xia leucocitária ou pela inibição da expressão de determinados mediadores pró-inflamatórios daí que lhe seja atribuída capacidade neuroprotectora em animais com isquemia focal cerebral (Irjanheikki *et al.*, 1999). Muitos dos estudos iniciais foram conduzidos com doxiciclina e minociclina, tetraciclinas semi-sintéticas com abrangente uso na prática medica e dentária. A doxiciclina foi estudada exaustivamente como agente anti-tumoral e exerce efeitos inibidores na produção e actividade das MMP-2 e -9, por exemplo em linhas de células de neoplasia da mama. Em ratos com isquémia cerebral induzida, a doxiciclina provou ser neuroprotectora revelando uso potencial como composto anti-isquémico por providenciar protecção microvascular e inibir o sistema fibrinolítico (Burggraf *et al.*, 2006).

As moléculas pertencentes ao grupo das tetraciclinas possuem características estruturais conservadas que lhe permitem manter a acção farmacológica: a configuração do átomo de carbono em C4, comprovada na figura 1.7, a presença do grupo amida em C2, a ausência de grupos metilo e hidroxilo no carbono 6 e a manutenção do grupo tetracíclico composto pelos anéis A, B, C e D são requisitos essenciais para a acção biológica desta família de moléculas (revisto por Pereira-Maia *et al.*, 2010). A minociclina difere das outras tetraciclinas por incluir no seu espectro de acção a patogénica *Neisseria meningitis* sendo usada na profilaxia meningocócica. É bem absorvida a partir do intestino, mesmo após as refeições pelo que apresenta uma das melhores taxas de absorção de todas as tetraciclinas quando administrada *per os*, com um tempo de semivida entre 16 e 18 horas. Distribui-se um pouco por todo o organismo, depositando-se nas células reticuloendoteliais do fígado, baço e medula óssea. Surge na urina e nas fezes, mas em menor quantidade que as restantes tetraciclinas.

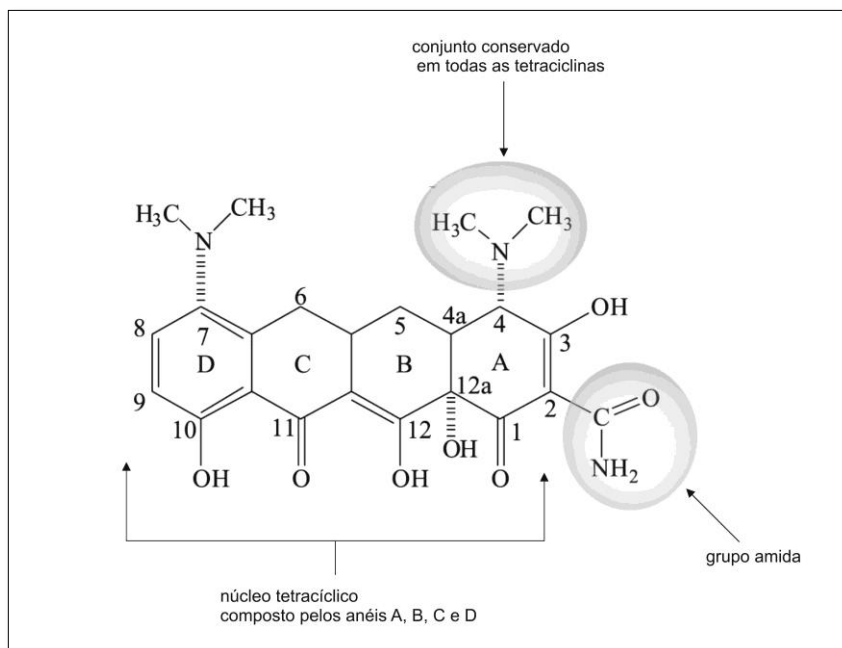


Figura 1.7 - Estrutura bidimensional da minociclina. A ação farmacológica deste grupo de antibióticos deve-se a estruturas conservadas em todas as tetraciclina como o grupo amida em C2 ou a configuração de C4. FONTE: Pereira-Maia, E. C., Silva, P. P., Almeida, W. B., Santos, H. F., Marcial, B. L., Ruggiero, R., et al. (2010). Tetraciclina e gliciliciclina: uma visão geral. *Quim. Nova*, p. 701

É metabolizada, em grande parte, no fígado e parcialmente excretada na urina e na biliar, com uma reabsorção ao nível da circulação entero-hepática (Brunton *et al.*, 2008). Ao contrário de outras tetraciclina que são prejudiciais ao rim, a dose de minociclina não necessita ser reduzida em casos de dano renal (Bennett & Brown, 2003) persistindo esta droga no organismo muito tempo após terminar o tratamento.

2 - Material e Métodos

2.1 - Animais e Parasitas

Foram inicialmente constituídos dois grupos com 20 fêmeas *Mus musculus* CD1 com cinco a oito semanas de idade, escolhidas aleatoriamente. O primeiro grupo, o controlo, é designado G1 e o grupo de animais submetidos a quimioterapia com minociclina, G2. Todos os animais foram obtidos e mantidos em condições adequadas, no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) de Lisboa.

A estirpe utilizada de *T.b. brucei* GVR 35/1.5 deriva de tripanossomas originalmente isolados em animais selvagens do Serengeti, em 1966. O estabilato clonado em meio PBS-glicose foi obtido com parasitas em sangue fresco de animais com infecção comprovada por observação microscópica.

2.1 - Tratamento farmacológico com Minocin®

Dois dias antes da infecção com tripanossomas (0-2 DPI) deu-se início ao tratamento com minociclina ao grupo tratado na dose de 50 mg/kg/dia. Após dois dias de tratamento (0 DPI), foram infectados todos os animais de ambos os grupos com cerca de 500 parasitas por animal, via intraperitoneal. Continuou-se o tratamento com a mesma dosagem por animal até 5 DPI, cinco dias pós-infecção, altura em que se reduziu a dose para 25 mg/Kg/dia em igual quantidade de solvente. Manteve-se o mesmo esquema de administração da minociclina uma vez por dia até 13 DPI, altura em que se suspendeu o tratamento. A minociclina usada (Minocin®,TEOFARMA) apresenta-se sob a forma de cloridrato em comprimido revestido de 100 mg a ser macerado na altura da administração. A diluição conseguiu-se em 4 ml de água destilada agitando até dissolução completa, sendo a solução resultante homogeneizada entre a administração a animais consecutivos. Foram administrados 0,1 ml *per os* de solução aquosa correspondendo a 1,25 mg do composto a cada animal, com recurso a uma seringa descartável de 1 ml e agulha

curva de ponta romba (Fig. 2.1). Dado a cada animal controlo 0,1 ml do solvente (água destilada).



Figura 2.1 – A administração da minociclina com recurso a uma agulha de ponta romba. Após a homogeneização da solução contendo o fármaco, a instilação de 0,1 ml fez-se com recurso à imobilização dos animais pela região cervical, conforme ilustra a figura.

2.2 - Dados biométricos

Todos os animais foram pesados aquando da constituição dos grupos, em balança digital Beetle (Lan Technics), seguindo-se a medição da massa corporal nos dias 0 DPI, 5 DPI, 8 DPI, 13 DPI e 20 DPI, no mesmo aparelho. Foram também anotadas as massas e características de comportamento dos murganhos que poderiam ser de alguma forma desviantes e de desigualdade entre os grupos. Deu-se principalmente importância à letargia e ao alheamento à manipulação. Depois dos sacrifícios realizados em 20 DPI, os animais restantes serviram o propósito de avaliar o padrão de mortalidade natural em ambos os grupos, contudo a avaliação deste parâmetro não faz parte dos objectivos do estudo.

2.3 - Obtenção de Material biológico

Para cada ponto de colecta, foram sacrificados três animais de cada grupo nos tempos 0 DPI, 5 DPI, 8 DPI, 13 DPI e 20 DPI, após a determinação da massa corporal, de acordo com o desenho experimental apresentado na figura 2.2. Depois de identificados com os números de um a três dentro de cada grupo, foram anestesiados e colhido sangue por punção cardíaca para hemograma realizado electronicamente em aparelho *Abacus Júnior* (Diatron). Este aparelho utiliza o princípio Coulter para a detecção de partículas ao gerar uma variação na impedância eléctrica, causada por cada um dos tipos de células, entre dois eléctrodos colocados nos dois lados de uma abertura ou zona de detecção. Do fluxo constante e pela medição das diferentes impedâncias, chega-se ao

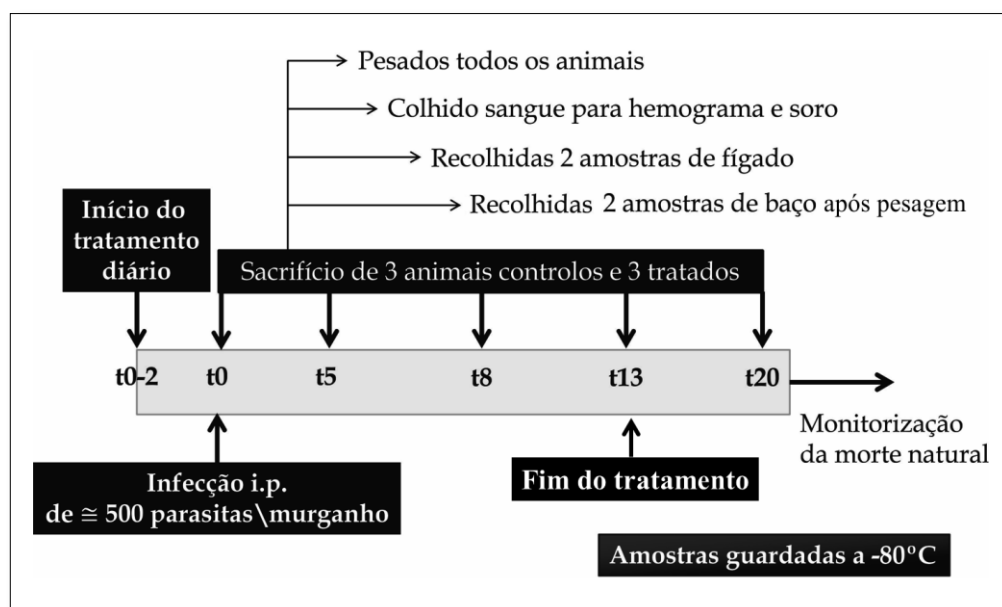


Figura 2.2 -Esquema geral do desenho experimental. Dois dias antes da infecção iniciou-se o tratamento com minociclina que se estendeu até 13 DPI. Cinco, oito, treze e vinte dias depois da inoculação dos parasitas, sacrificaram-se três animais de cada grupo para recolha de vários dados e material biológico.

número final de células por unidade de volume. Como forma de evitar enviesamentos das concentrações celulares, padronizou-se empiricamente a quantidade de heparina sódica utilizada no sangue total para hemograma: 10 µL. O soro foi obtido por centrifugação a 2.000 rpm em centrífugadora *Hermle Z323K* (Citomed) após arrefecimento a

4°C (dez minutos) e posteriormente a 37°C (vinte minutos) no próprio dia dos sacrifícios.

Por incisão toraco-abdominal mediana foram recolhidas duas amostras de fígado e após medido o baço, recolhidas também duas amostras deste órgão. Todos os tecidos foram guardados em tubos de microcentrifuga com 0,5 ml de tampão de lise (0,5% NP40, 120 mM de NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.8 em água ultra pura) e congelados a -80°C até posterior uso.

Os esfregaços, para contagem de parasitas, foram realizados segundo protocolo de coloração de Giemsa (De Sousa, 2008). Esse protocolo consiste em deixar secar as lâminas cerca de uma hora e cobri-las com metanol para fixação durante um minuto. Findo esse período retira-se o excesso de metanol e deixam-se secar novamente durante dois a três minutos. Para cada 10 ml de água tamponada pH 7.2 são adicionadas vinte gotas de corante (10 ml de solução para cada duas lâminas) e depois foram cobertos todos os esfregaços durante 30 minutos com essa solução. Ao fim desse tempo foram lavadas com um fio de água e deixadas a secar pelo menos doze horas antes de proceder à preparação definitiva. As contagens foram realizadas a 400x, apontando o número de parasitas por 50 leucócitos em campos consecutivos. A zona contada corresponde ao último terço dos esfregaços a contar do local de início do espalhamento.

2.4 - Determinação de mediadores inflamatórios nos murganhos infectados

2.4.1 - Quantificação de Óxido Nítrico (NO)

O NO foi obtido através do Método de Griess (1879). Realizada recta de calibração em placa de microtitulação de 96 poços (NUNC), com solução padrão de nitrito 100 M de NO pertencente ao *kit Griess Reagent System* (Promega). Nos três primeiros poços da fila A adicionados 50 µl da solução padrão e à fila B igual volume da mesma solução. De seguida colocados 50 µl de água destilada nos três poços das filas B a H e realizadas diluições seriadas (1:2) com as concentrações de NO por poço a variar conforme a figura 2.1. Clarificam-se as amostras de resíduos celulares ou materiais insolú-

veis por centrifugação a 1300 rpm, durante cinco minutos antes do ensaio e os poços são preenchidos de preferência em duplicado. São adicionados 50 µl de cada amostra sérica por poço, seguindo-se a adição imediata de 50 µl da solução de sulfanilamida 1% em 5% de ácido fosfórico.

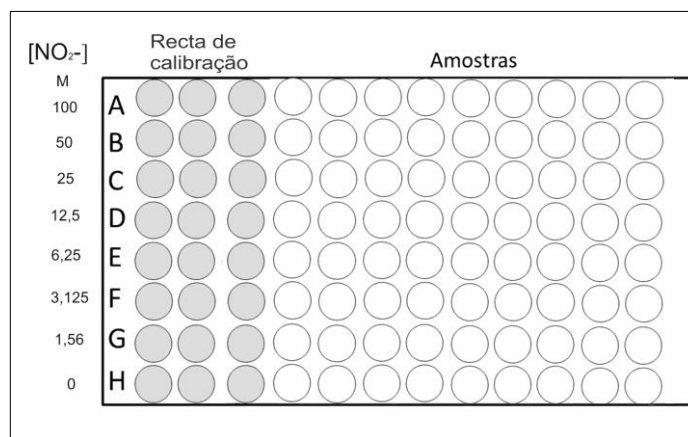


Figura 2.1 - Representação esquemática da placa de microtitulação para obtenção do NO sérico através do método de Griess.

Após incubação das placas durante dez minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz, adicionam-se mais 50 µl da solução NED (N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride a 0,1% em água) a todos os poços, com mais 10 minutos de incubação protegidos da luz. As densidades ópticas são obtidas por leitura das placas a 490 nm em espectrofotómetro 680 Microplate Reader (Bio-Rad EUA). A determinação das concentrações de NO faz-se através da equação da recta de calibração, pela Lei de Lambert-Beer.

2.4.2 - Quantificação de Interleucina (IL)-4 sérica

Para a quantificação de IL-4 no soro recorreu-se à técnica de ELISA fazendo uso do kit comercial *DuoSet Elisa mouse IL-4* (R&D systems) e das soluções de PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM de KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄ pH 7.4, filtrada a 0,2 µm); tampão de lavagem (Tween 20 a 0,05% em PBS pH 7.4); diluente reagente (BSA a 1% em PBS pH 7.4, filtrada a 0,2µm); solução substrato (1:1 de H₂O₂ e tetrametilbenzidina) e solução de paragem da reacção (4N H₂SO₄). Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Para a preparação das placas, foram previamente adicionados a cada poço 100 μ L do anticorpo de captura (anti-IL-4) fornecido pelo *kit* diluído em PBS e com uma concentração de 4 μ g/ml. Deixou-se em incubação durante a noite para de seguida ser aspirado o conteúdo dos poços e realizadas três passagens com 400 μ L de tampão de lavagem. Após a última lavagem e para remoção de todos os vestígios desse tampão procedeu-se ao bater vigoroso da placa invertida contra folhas de papel limpas. Os poços foram bloqueados com 300 μ L de diluente reagente/cada e incubados durante uma hora. Seguiram-se três novas lavagens, como já descrito. Aos dois primeiros poços das filas A a H, adicionou-se em duplicado a solução padrão de IL-4 (proteína recombinante) fornecida pelo *kit* com as diluições conhecidas a variarem conforme mostra a figura 2.3, para o cálculo posterior da recta de calibração.

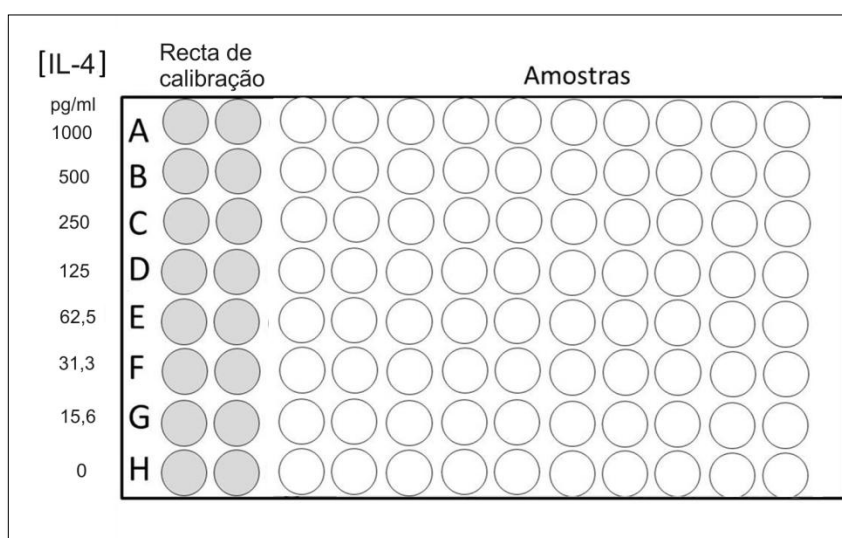


Figura 2.3 – Esquema representativo da placa de microtitulação para a quantificação das quantidades de IL-4 em amostras de soro.

Adicionaram-se aos restantes poços 100 μ L de soro das amostras diluídas em reagente diluente (1:100) que ficaram a incubar duas horas. Após mais três lavagens acrescentou-se a cada poço 100 μ L de anticorpo de detecção (anti-IL-4 conjugado com biotina), fornecido no *kit*, diluído em reagente diluente com uma de concentração 600 ng/ml. Seguiram-se duas horas de incubação e novas três lavagens. Findo esse período, adicionados 100 μ L da solução de estreptavidina conjugada com peroxidase de rábano diluída em reagente diluente a 1:4000 a cada poço. Esperaram-se 20 minutos de incuba-

ção e realizaram-se novas três lavagens. A placa foi novamente incubada durante 20 minutos depois da adição de 100 µL de solução substrato aos poços. A reacção foi suspensa com a adição da solução de paragem e os resultados obtidos por leitura a 450 nm em 680 Microplate Reader (Bio-Rad, EUA).

2.4.3 - Quantificação de Interferão (IFN)- γ

Para a determinação do título de IFN- γ no soro recorreu-se à técnica de ELISA fazendo uso do *kit* comercial *DuoSet Elisa mouse IFN- γ* (R&D systems) e das soluções de PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM de KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7.4, filtrada a 0,2 µm); tampão de lavagem (Tween 20 a 0,05% em PBS pH 7.4); tampão de bloqueio (BSA a 1% em PBS com NaN₃ a 0,05%), diluente reagente (BSA a 0,1%, Tween 20 em TBS a 0,05% , pH 7.4 e filtrado a 0,2 µm); solução substrato (1:1 de H₂O₂ e tetrametilbenzidina) e solução stop (4 N H₂SO₄). Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Para a preparação das placas, foram previamente adicionados a cada poço 100 µL do anticorpo de captura (anti-IFN-gama) fornecido pelo *kit* diluído em PBS e com uma concentração de 4 µg/ml. Deixou-se em incubação durante a noite para de seguida ser aspirado o conteúdo dos poços e realizadas três passagens com 400 µL de tampão de lavagem. Após a última lavagem, para remoção de todos os vestígios desse tampão, procedeu-se ao bater vigoroso da placa invertida contra folhas de papel limpas. Os poços foram bloqueados com 300 µL de tampão de bloqueio/cada e incubados durante uma hora. Seguiram-se três novas lavagens, como já descrito. Aos dois primeiros poços das filas A a H, adicionou-se a solução padrão de IFN- γ fornecida pelo *kit* com as diluições conhecidas a variarem conforme mostra a figura 2.4 para o cálculo posterior da recta de calibração. Adicionaram-se aos restantes poços 100 µL de soro das amostras diluídas em reagente diluente (1:100) que ficaram a incubar duas horas. Após mais três lavagens acrescentou-se a cada poço 100 µL de anticorpo de detecção (Anti-IFN-gama conjugado com biotina), fornecido no *kit*, diluído em reagente diluente com uma de concentração 800 ng/ml. Seguiram-se duas horas de incubação e novas três lavagens. Findo esse período, adicionados 100 µL da solução de estreptavidina conjugada com peroxidase de rábano diluída em reagente diluente a 1:4000 a cada poço. Esperaram-se os vinte minutos necessários de incubação e realizaram-se novas três lavagens. A placa

foi depois novamente incubada mais vinte minutos após adição de 100 µL da solução substrato aos poços. A reacção foi suspensa com a adição da solução de paragem para a reacção e os resultados obtidos por leitura a 450 nm em 680 *Microplate Reader* (Bio-Rad, EUA).

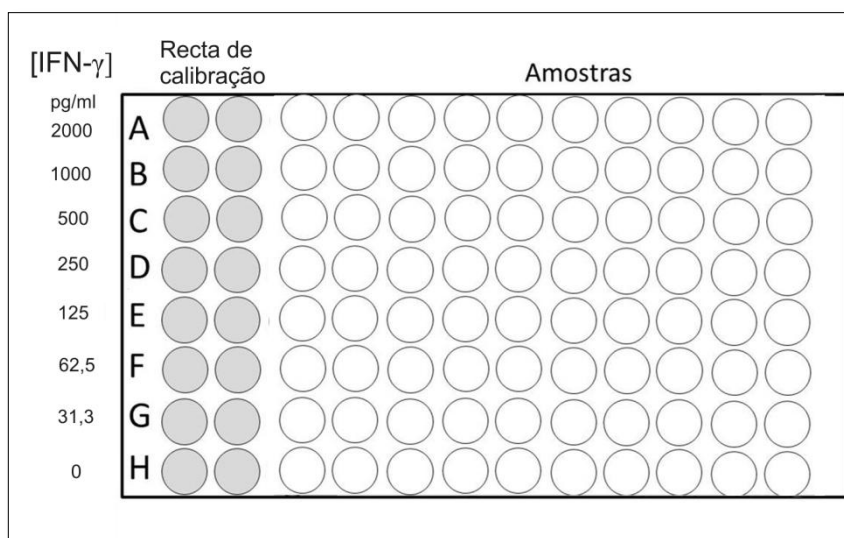


Figura 2.4 - Esquema representativo da placa de microtitulação para a quantificação das quantidades de IFN-γ em amostras de soro.

2.4.4 - Determinação de Anticorpos específicos anti - *T.b.brucei*

Os anticorpos IgM e IgG totais *anti-T.b.brucei* assim como as subclasses IgG1, IgG2a e IgG3 foram obtidas através da técnica de ELISA de acordo com o procedimento realizado por Silva *et al.*, 2009. Utilizadas as soluções tampão bicarbonato (0,1 M pH 8.5); tampão de lavagem (PBS – Tween 20 a 0,05%); tampão de bloqueio (PBS - Tween 20 a 0,05% e BSA a 5%); tampão anticorpo (PBS – Tween a 0,05%, BSA a 1%); tampão de paragem (4N H₂SO₄) e tampão citrato (ácido cítrico 0,1 M e fosfato de sódio 0,1 M, pH 5.0).

Nos poços da placa de microtitulação adsorveram-se 100 µg de extracto proteico de *Trypanosoma brucei brucei*, previamente purificado a partir de sangue total de murhanhos infectados. Permaneceram em incubação durante a noite a 4°C e no dia seguinte

procedeu-se a três lavagens com 200µL/poço de tampão de lavagem. Após a última, para remoção de todos os vestígios desse tampão, bateu-se vigorosamente com a placa invertida contra folhas de papel limpas. Ulteriormente foram adicionados, a cada poço, 200 µL de tampão de bloqueio e deixados a incubar durante uma hora. Todas as incubações a partir deste ponto são à temperatura ambiente e com as amostras protegidas da luz. Seguiram-se três novas aplicações de tampão de lavagem com 200 µL/poço cada, após as quais se aplicaram as amostras de soro diluídas 1:100 em tampão de anticorpo. Deixou-se incubar mais uma hora e seguiram-se cinco lavagens nas mesmas condições que as anteriores. Aplicaram-se então 100 µL/ poço, do anticorpo secundário específico com peroxidase de rábano diluído 1:4000 em tampão de anticorpo. Seguiu-se, respectivamente, nova incubação das placas uma hora e cinco novas lavagens nas condições já descritas. Adicionados então 100 µL/ poço de substrato da peroxidase de rábano (20 µg de OPD em 20 ml de tampão de citrato, 10 µL de H₂O₂) e incubou-se uma última vez durante 30 minutos, antes da adição da solução de paragem para a reacção. A reacção foi avaliada por densidades ópticas, obtidas a 490 nm em aparelho *680 Microplate Reader* (Bio-Rad, EUA).

2.5 - Obtenção e quantificação de RNA em amostras de fígado e de baço dos animais infectados

O RNA total foi isolado de macerados de fígado e baço através de kit comercial *Isolate RNA mini kit* (Bioline, UK-UK) de que se descreve o protocolo: Após a maceração de todas as amostras foi adicionado a cada uma delas 450 µL de tampão de lise R e homogeneizada a solução resultante. Transferido para novo tubo colector e realizada centrifugação a 10.000 rpm durante um minuto. Recolhidos os supernadantes para a coluna *spin R1* colocada em tubo colector e centrifugados durante dois minutos a 10.000 rpm, salvando o filtrado ao que se adicionou um volume de etanol a 70%. Após homogeneização da solução esta foi transferida para a coluna *spin R2* inserida em novo tubo de colecta. Nova centrifugação a 10.000 rpm por 2 minutos e, salvando a coluna R2 adicionaram-se 500 µL de tampão de lavagem AR ao que se seguiu nova centrifugação a 10.000 rpm por um minuto. Depois de colocada a coluna R2 em novo tubo colector foram adicionados 700 µL de tampão de lavagem BR. Nova centrifugação a 10.000

rpm por um minuto. Depois das duas lavagens, a coluna R2 foi colocada em novo tubo colector e adicionados 50 µL de água sem RNase à membrana da coluna. Depois de encubação durante um minuto à temperatura ambiente realizou-se a última centrifugação a 6 000 rpm para eluir o RNA. As amostras foram guardadas a -80°C após medição das absorvâncias em espectrofotómetro *SmartSpec Plus* (Bio-Rad EUA) para determinação das concentrações e grau de pureza do RNA obtido. O cálculo da concentração de RNA fez-se pela fórmula:

$$[\text{RNA}] = A_{260\text{nm}} \times \text{Fc} \times \text{fd}$$

Onde $A_{260\text{nm}}$ é valor de leitura da amostra a 260 nm; **Fc** corresponde ao factor de conversão no qual a A_{260} máxima é 1 e corresponde a 40 µg/mL de RNA; **fd** corresponde ao factor de diluição da amostra de leitura (neste caso corresponde ao valor 40).

2.6 - Obtenção e quantificação de cDNA das amostras de fígado e baço dos animais infectados

Foram sintetizadas cadeias de DNA complementar ao RNA por utilização de *kit cDNA Synthesis Kit* (Bioline, UK) que se descreve de seguida: Preparada no gelo a solução A contendo 1 µg de RNA previamente obtido, com o volume pipetado a depender da concentração anteriormente estabelecida, os *primers* oligo (dT)₁₈ e *Random hexamer primers* (0,5 µL + 0,5 µL), as quatro bases em solução (dNTP) (1 µL) e água tratada com DEPC q.b. para o volume final de 10 µL. As amostras foram então encubadas a 65°C por dez minutos e colocadas no gelo por mais dois minutos. A solução B (4 µL de tampão 5x RT, 1 µL de inibidor de RNase, 0,25 µL de transcriptase reversa a 200 UI/µL e água tratada com DEPC q.b. para 10 µL) foi adicionada à solução A e encubados todos os tubos durante 30 minutos entre 37 e 39°C. Para terminar a reacção, as amostras foram então aquecidas a 70°C durante 15 minutos e mantidas no gelo.

O uso da mistura dos dois tipos de *primers* na solução A deve-se a que durante a optimização do protocolo não se verificaram diferenças nas bandas obtidas por PCR do produto de cDNA amplificado em soluções utilizando cada um dos *primers* em separado ou juntos na mesma solução. Como esta é uma opção validada pela descrição do pro-

protocolo no *kit*, foi a escolhida também como forma de rentabilizar os produtos. Aumenta-se também a probabilidade de codificação para cDNA de mais zonas do mRNA através da codificação das caudas poli-A encontradas na terminação 3' da maioria dos mRNA dos eucariotas através do *primer* Oligo (dT)₁₈ ou pela codificação aleatória de cDNA de vários tamanhos a usar o RNA total como molde. O material foi armazenado a -20°C até posterior uso.

2.7 - Optimização de PCR para interleucinas e metaloproteínases

Realizaram-se amplificações por PCR para IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ e MMP-2, MMP-9 e MMP-12, para além da β actina, utilizada como controlo positivo. As soluções sujeitadas aos termociclos foram elaboradas da mesma forma, variando as temperaturas de *annealing*, calculadas durante a optimização dos protocolos. As sequências dos oligonucleótidos (*primers*) sintetizados pela ThermoScience (Alemanha) e os respectivos amplicões de cDNA encontram-se na tabela 2.1.

PRIMERS	sense (5' \rightarrow 3')	cDNA amplicões(pb).
	antisense (5' \rightarrow 3')	
B-actina	TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G	348 ^{a)}
IL-2	GAG TCA AAT CCA GAA CAT GCC GCA G TGA TGG ACC TAC AGG AGC TCC TGA G	167 ^{a)}
IL-4	CGA AGA ACA CCA CAG AGA GTG AGC T GAC TCA TTC ATG GTG CAG CTT ATC G	180 ^{a)}
IL-6	TGG AGT CAC AGA AGG AGT GGC TAA G TCT GAC CAC AGT GAG GAA TGT CCA C	154 ^{a)}
TNF- α	GGC AGG TCT TTG GAG TCA TTG C ACA TTC GAG GCT CCT CCA GTG AAT TCG G	307 ^{a)}
IFN- γ	AGC GGC TGA CTG AAC TCA GAT TGT AG GTC ACA GTT TTC AGC TGT ATA GGG	243 ^{a)}

PRIMERS (continuação)	sense (5' → 3')	cDNA amplificações(pb).
	antisense (5' → 3')	
MMP-2	CCC ATG AAG CCT TGT TTA CCA TGG AAG CGG AAC GGA AAC T	69 ^{b)}
MMP-9	TAT TTT TGT GTG GCG TCT GAG AA GAG GTG GTT TAG CCG GTG AA	71 ^{b)}
MMP-12	TGT GGA GTG CCC GAT GTA CA AGT GAG GTA CCG CTT CAT CCA T	39 ^{b)}

Tabela 2.1 - Sequências de *primers* utilizados para cada um dos mediadores e o tamanho respectivo dos pares de bases de cDNA amplificados.

FONTES: ^{a)} Balkwill,F; Cytokines, a practical approach series, 2^a ed.; Oxford University Press; 1995;
^{b)} Masocha, W., Rottenberg, M. E., & Kristensson, K. (2006). Minocycline Impedes African Trypanosome Invasion in the brain of the murine model. *Amer. Soc. for Microbiol.*, 1798–1804.

As soluções foram preparadas com recurso ao BIOTAQ PCR *kit* (Bioline, UK). Cada uma das soluções a ser amplificada é composta por 2 µL de cDNA total previamente obtido, 5 µL de tampão concentrado 10x de NH₄, 5 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de dNTP mix 10 mM, 1 µL de *primer sense*, 1 µL de *primer antisense* de cada um dos mediadores e eluidos 100x (excepto para as MMP para os quais se fez uma eluição de 1:10), 2 unidades de DNA polimerase Taq e água bidestilada q.b. para completar o volume final de 50 µL. Os termociclos e as diferentes temperaturas de *annealing* encontram-se descritos na tabela 2.2

Para a leitura dos resultados de PCR realizaram-se géis de agarose a 2% para as citocinas e a 2,5%, para as MMP, em solução tampão TAE a 1x com 7 µL de EtBr (10mg/ml) para cada 150 ml de solução preparada. A 20 µL da solução amplificada misturaram-se 5 µL de tampão de carregamento *loading dye* 6x (Bioline, UK). Depois de polymerizados, os géis foram imersos em tampão TAE na tina de electroforese e carregados os poços, correspondendo o primeiro ao marcador HyperLadder IV (Bioline, UK). Para a migração dos fragmentos dos ácidos nucleicos foi aplicada uma corrente constante de 90V e os resultados foram obtidos através da leitura dos géis à luz UV em aparelho UVIDOC.

Ciclo	Duração	°C		°C
1	2'	94	β - actina	60
2	30''	94	IL - 2	60
3	1'30''		IL - 4	56
4	2'	72	IL - 6	56
5	Repetição 34x		TNF - α	60
6	10'	72	IFN - γ	58
7	+ ∞	4	MMP 2	54
			MMP 9	54
			MMP 12	54

Tabela 2.2 – Esquematização dos termociclos realizados para a amplificação dos diferentes *primers*, com as temperaturas de *annealing* a variar conforme explicita o quadro da direita, para cada um dos mediadores.

2.8 - Actividade de Metaloproteinasas por zimografia

Antes da realização das zimografias, os extractos proteicos totais de amostras de baço e fígado guardados previamente em tampão de lise foram utilizados para a quantificação de proteína total. Para isso recorreu-se ao Método de Bradford (1976) com *kit* comercial BCA (Bio-Rad, EUA) o que permitiu, durante a optimização do protocolo, ter conhecimento prévio da massa real de proteína aplicada por poço. Para recta de calibração nos poços A, B e C da placa de microtitulação (NUNC) realizaram-se diluições seriadas da solução de BSA em PBS, com o volume de cada poço a ser de 150 µL, para concentrações a variarem de 2 mg/ml a 0 mg/ml conforme ilustra a figura 2.2. Depois de adicionadas as amostras a cada um dos poços (diluição 1:30, em PBS) foi adicionado a todos os poços 145 µL da solução comercial, perfazendo um volume total de 300 µL. As placas foram lidas a 655 nm depois da sua incubação durante 30 minutos protegidas da luz.

Os resultados são calculados através da aplicação da lei de Lambert-Beer pela equação $y=mx+b$, recta de regressão linear das densidade ópticas (DO) dos poços com concentração conhecida de BSA. y representa o parâmetro absorvância e x a concentração desconhecida que se pretende calcular para cada uma das amostras.

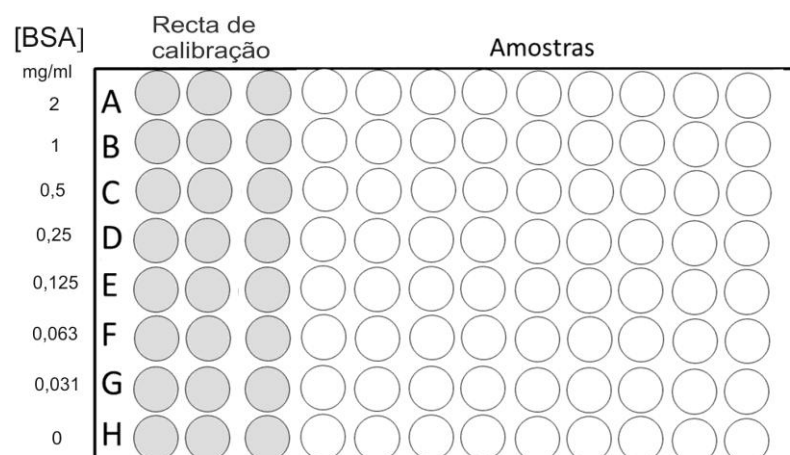


Figura 2.5 – Placa de microtitulação representativa das concentrações conhecidas de BSA para obtenção das concentrações das soluções contendo amostras de fígado e baço. Substituindo as DO das amostras na equação da recta obtida das DO da recta padrão chega-se aos valores procurados.

Optimizado o protocolo, correram-se géis de acrilamida a 10% com 1,5 ml de gel de “stacking” ou empacotamento de uma solução composta por 2,5 ml água Mili-Q, 333 µL de Tris-HCl 0,6 M; 450 µL de Acrilamida (SIGMA); 33 µL de SDS a 10%; 16,6 µL de solução saturada de persulfato de amónia e 4,8 µL de TEMED. Para o gel de corrida (3 ml) utilizou-se a solução contendo 9,05 ml de água Mili-Q; 4 ml 1,8 M Tris-HCl; 6,65 ml Acrilamida; 200 µL SDS 10%; 100 µL Persulfato de amónia; 20 mg Gelatina de soro bovino e 7 µL de TEMED. Após aplicação do tampão de zimografia (Bio-Rad, EUA) (1/3 vv) nas amostras, aplicados 10 µL a cada poço e utilizou-se o marcador HyperPAGE (10 a 190 kDa, Bioline, UK). Correram-se todos os géis a 4°C com corrente eléctrica constante de 90V em condutor SDS 1:1 em água destilada. Após a corrida feita imersão em 100 ml de solução com tampão renaturante composto por Triton X a 2,5% em água destilada, em média, duas horas à temperatura ambiente e com agitação suave. Findo este período, após lavagens com água destilada, deixaram-se os géis em 100 ml de solução de desenvolvimento contendo 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, a 37°C e sem agitação durante a noite. A coloração foi conseguida

com recurso a Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, EUA) durante 3 horas e descorados depois com recurso a várias passagens de solução contendo 10% de metanol e 5% ácido acético glacial em água destilada.

2.9 - Amostragem e tratamento estatístico

Os animais de ambos os grupos dão origem a amostras com três elementos cada em cada momento de sacrifício, numerados e escolhidos aleatoriamente. O tratamento estatístico e a representação gráfica dos dados são feitos com recurso aos programas Excel versão 2010 (Microsoft) e *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 17 (IBM).

3 - Resultados

Neste capítulo organizam-se os principais resultados obtidos e que serão alvo de discussão no capítulo seguinte, Discussão e Conclusões. A esquematização inicia-se com os dados de medição da massa corporal dos animais assim como o tamanho esplénico. Dentro dos valores hematológicos posicionam-se os resultados de hemogramas e leucogramas bem como a parasitémia dos animais sacrificados. Segue-se à quantificação sérica de IL-4, IFN- γ e NO a determinação das classes e subclasses de anticorpos anti-*T.b. brucei*. Por fim expressam-se os resultados relativamente a avaliação de metaloproteinases por zimografia, bem como os resultados de optimização de PCR para análise da expressão dos genes de citocinas e de metaloproteinases.

3.1 - Dados de medição directa

Na tabela 3.1 representam-se aspectos clínicos dos animais relacionados com a emissão de sons guturais e a presença de letargia. Relativamente à emissão de sons guturais, vocalizações anómalas caracterizadas por murmúrios ou gargarejar de fraca intensidade, observou-se nos animais tratados durante todos os dias da administração *p.o.*, o que não aconteceu, em nenhum momento, nos animais controlos. No que diz respeito à letargia, traduzida pelos movimentos mais lentificados ou menor resistência à manipulação humana, está presente uma primeira vez entre o sétimo e o oitavo dias pós infecção. Surge aí em grau semelhante nos dois grupos, o que não acontece quando ficam novamente mais letificados, após o décimo sexto dia em que os controlos evidenciam maior restrição de movimentos, mais que os tratados que se mostram também alheados do meio envolvente. A partir do vigésimo segundo dia todos os animais apresentam restrições severas do movimento e revelam desequilíbrio na marcha. A partir desta altura começam a ocorrer mortes naturais, com os óbitos a iniciarem-se dois dias após o último ponto de colheita. Com cinco animais que não foram sacrificados em cada grupo a partir do vigésimo dia, os dois tratados restantes sucumbem ao parasita no 26º dia an-

tes de cessar a experiência com a morte do último controlo. Vinte e sete foi o número total de dias que o animal mais resistente sobreviveu e que corresponde a um *Mus musculus* não tratado.

	Mortes Naturais		Comportamento anormal		Letargia	
DPI	G1	G2	G1	G2	G1	G2
[0-2; 6]	0	0	-	Sons guturais	-	-
[7; 8]	0	0	-	Sons guturais	+	+
[9;13]	0	0	-	Sons guturais	-	-
[16; 21]	0	0	-	-	++	+
22	1	1	-	-	++	++
24	2	1	-	-	+++	+++
25	1	1	-	-	+++	+++
26	0	2	-	-	+++	-
27	1	0	-	-	-	-

(-) – Não apresenta alterações;

(+) – Ligeiras alterações no movimento com interacção inter-animal mantida, tentando escapar vigorosamente à manipulação;

(++) – Reacção não imediata a estímulos externos, como sons estranhos. Cansaço mais evidente, com tentativas em sobre-esforço de fuga à manipulação;

(+++)- Alheados de estímulos externos. Sem reacção de fuga à manipulação, com mobilidade reduzida a 2-3 passadas consecutivas, com dificuldade extrema em manter o equilíbrio.

Tabela 3.1 –Dados resultantes da observação directa da evolução da infecção dos murganhos em ambos os grupos. Os animais tratados apresentam sons guturais, vocalizações anómalas caracterizadas por murmúrios ou gargarejar de fraca intensidade, após a terapia com minociclina, o que não acontece nos controlos após administração de água destilada. A partir do décimo sexto dia de infecção os animais controlos apresentam-se menos reactivos que os tratados. As mortes naturais ocorrem a partir do vigésimo segundo dia de infecção e o último animal a sucumbir pertence ao grupo controlo.

Relativamente à massa corporal, todos os animais foram pesados em seis diferentes tempos do estudo como está apresentado no gráfico 3.1. A análise estatística com a variável “massa corporal” foi efectuada com intervalos de confiança de 95% e nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). Realizando análise à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para duas amostras independentes verifica-se que são ambas distribuições que se aproximam da curva normal ($0,229 < p < 0,998$). Comprovada a semelhança

das variâncias de ambos os grupos em todos os pontos de registo pelo teste de Levene ($0,79 < p < 0,874$) chega-se, pelo teste *t de Student* para amostras independentes, à conclusão de que não existe diferença significativa entre as médias aritméticas das amostras dos dois grupos ($0,158 < p < 0,956$). Resumindo, a evolução da massa corporal dentro dos grupos é similar, sem influência do factor discriminante “*minociclina*”. Realizando o teste T para amostras emparelhadas não se verificou diferença estatística na evolução da massa dos animais dentro do mesmo grupo ($p > 0,05$ para os pares 0-2 DPI e 0 DPI; 0 DPI e 20 DPI e 0-2 DPI e 20 DPI, dentro dos grupos controlo e tratado).

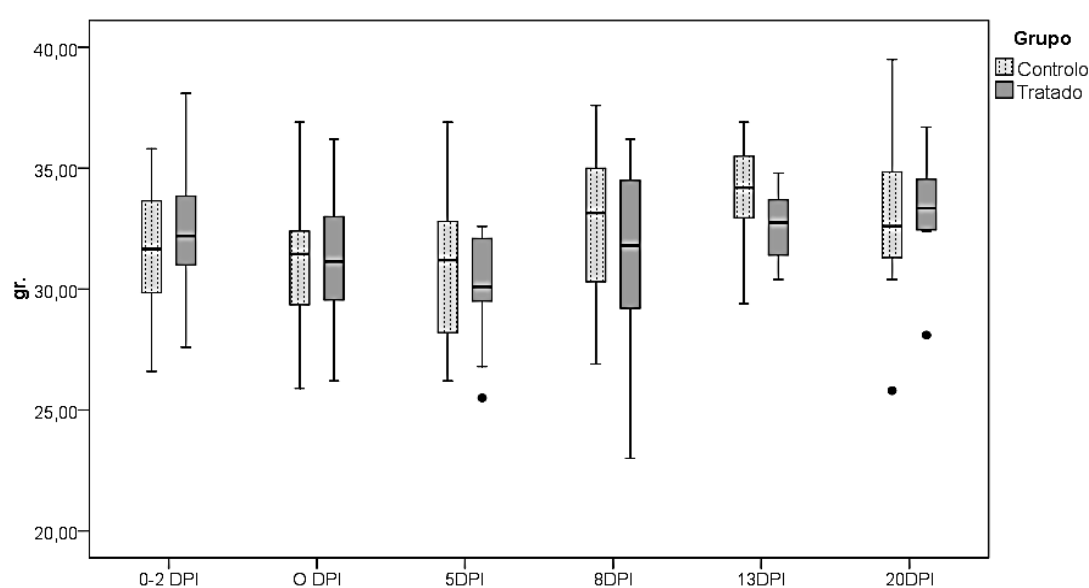


Gráfico 3.1 - Massa corporal dos animais intervenientes na experiência ao longo do tempo. Representação por diagrama de extremos e quartis da evolução dos valores relativos à massa corporal dos animais. Sem diferenças estatisticamente significativas dentro dos grupos e entre eles ao longo do tempo.

No gráfico 3.2 encontra-se a dispersão dos valores relativos ao tamanho dos baços dos animais sacrificados. Note-se que não apresentam grande dispersão entre si até 13 DPI, quer intra quer entre os grupos, o que não é válido em 20 DPI. Nesse ponto, um dos baços controlos apresenta dimensões semelhantes aos de 5 DPI, podendo ser considerado um *outlier* quando analisado no conjunto da evolução dos tamanhos deste órgão. Em 0 DPI os comprimentos dos baços encontram-se agrupados em redor dos 20 mm, situação válida para os dois grupos, pelo que se considera este valor o tamanho normal do órgão em questão, pois não foram ainda injectados tripanossomas nos animais. A partir de 5 DPI assiste-se ao aumento dos baços controlos para um valor médio de cerca

de 28 mm enquanto dois dos tratados se mantêm ainda próximos dos valores registados no ponto anterior (20 mm), com o restante baço a colocar-se ao nível dos controlos. Em 8 DPI o parâmetro quer dos controlos quer dos tratados agrupa-se a aproximadamente 34 mm, também sem grande dispersão entre os valores obtidos.

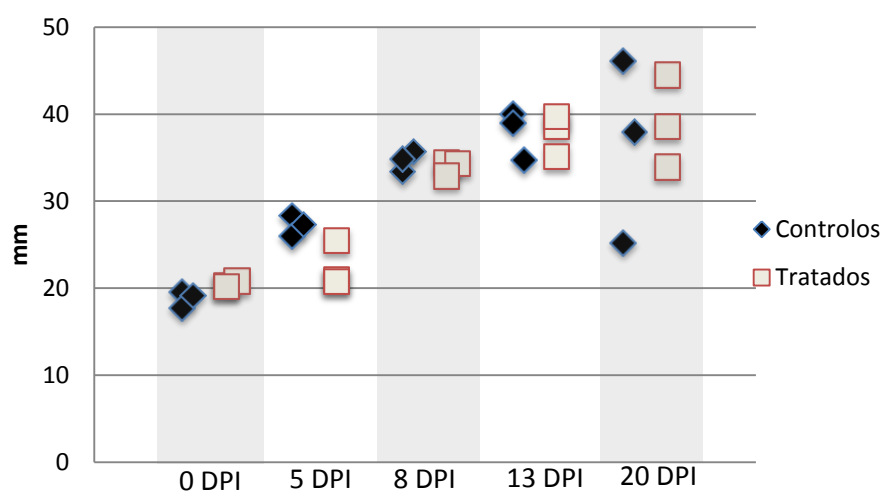


Gráfico 3.2 – Tamanho dos baços dos animais sacrificados. Evidência para um aumento gradual do tamanho dos baços em ambos os grupos, com maior dispersão dos valores dos animais tratados em 20 DPI.

No ponto seguinte, 13 DPI, dois dos baços controlos e dois dos tratados apresentam tamanhos próximos dos 39 mm e semelhantes entre si. Os outros dois órgãos, um de cada grupo são também idênticos no tamanho, cerca de 34 mm. Os valores de 20 DPI são os que apresentam maior amplitude dentro dos grupos (21 mm para G1 e 11 mm para G2). Um animal de cada grupo posiciona-se acima dos 40 mm (portanto com mais do dobro do tamanho dos baços iniciais) enquanto dois tratados e um controlo possuem um baço com tamanho entre os 30 e os 40 mm, pelo menos com mais 11 mm que os baços de 0 DPI. O baço controlo restante é um *outlier* por não apresentar um valor da ordem dos anteriores, medindo cerca de 25 mm.

3.2 - Valores hematológicos

3.2.1 - Parasitemia

A contagem de parasitas foi realizada no terço final dos esfregaços previamente corados e fixados. Como mostra o gráfico 3.3, as oscilações parasitárias são aparentemente consideráveis entre os pontos de colheita. A esquematização hipotética dos campos fornece, no gráfico, a ideia da diferença substancial entre as razões 1:10 e 1:100 respectivamente entre leucócitos e parasitas dando uma visão do fenómeno de multiplicação deste protozoário.

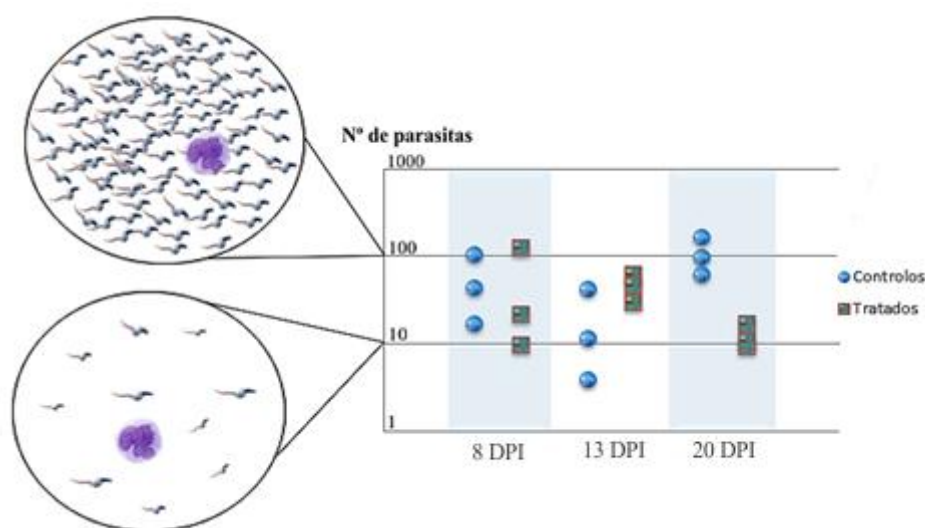


Gráfico 3.3 – Número de parasitas por unidade leucocitária. Verifica-se aparente maior dispersão dos valores nos tratados em 8 DPI e nos controlos em 13 DPI. Existe uma possível diferença nas parasitémias encontradas em 20 DPI entre os dois grupos, com os tratados a apresentar cerca de dez vezes menos parasitas que os animais do grupo controlo.

Em 5 DPI devido ao pequeno número de parasitas encontrado por lâmina, a proporção com 1 leucócito é inferior à unidade, pelo que não se mostram os resultados. A partir de 8 DPI é possível o estabelecimento de uma proporção entre leucócitos e parasitas respectivamente, com os controlos a apresentar entre os 16 e os 106 parasitas/leucócito. Os tratados possuem maior amplitude nos valores da proporção analisada (cerca de 105 parasitas de diferença entre as parasitémias maior e menor). Em 13 DPI,

os valores correspondentes aos máximos e mínimos para os dois grupos são diferentes, com as contagens a situarem-se nos controlos entre os 4 e os 42 par./leu. e nos animais tratados a oscilar entre os 30 e os 63 parasitas, portanto com parasitémias superiores nos tratados. A tendência inverte-se, do que se observa, nos dados relativos ao último ponto de colheita onde os animais tratados apresentam valores entre 9 e 17 par./leu. e os controlos possuem valores superiores, entre os 62 e os 167 parasitas, com amplitudes visivelmente díspares entre G1 e G2, neste tempo. É possível identificar, ainda que grosseiramente, uma ondulação no número de parasitas encontrados.

3.2.2 - Eritrograma

A 100 μ L do sangue extraído de cada animal sacrificado foram adicionados 10 μ L de heparina sódica e realizados hemogramas. Tratando-se de valores emitidos em número de células por unidade de volume, as quantidades de sangue e de anticoagulante foram padronizadas para todas as recolhas permitindo a sua comparação. Da observação do gráfico 3.4, tem-se que no dia da infecção os murganhos de G2 possuem maior concentração de glóbulos vermelhos que G1, situação que após o pico máximo em 5 DPI só volta a verificar-se no último ponto de recolha: 20 DPI.

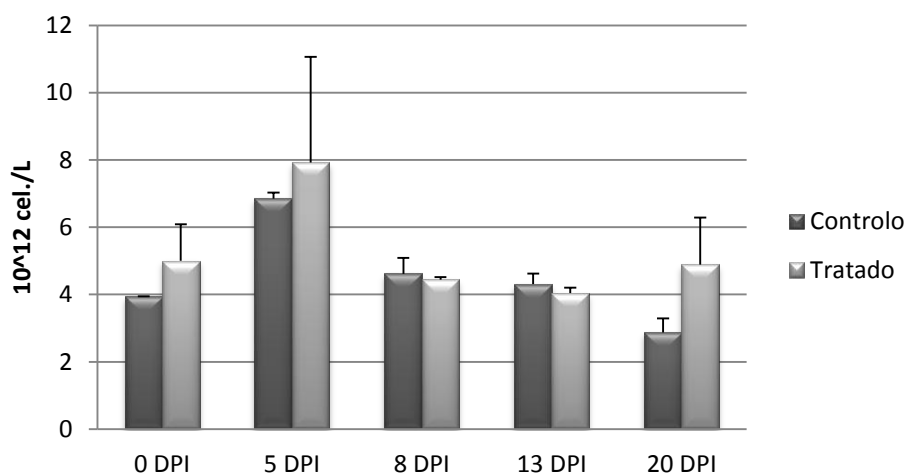


Gráfico 3.4 - Concentração de Eritrócitos Após 0 DPI e 5 DPI as concentrações do grupo tratado só são novamente superiores aos controlos em 20 DPI, com um valor próximo do inicial.

A evolução da concentração de eritrócitos dentro do grupo controlo é caracterizada por uma subida de cerca de 3×10^{12} cel./L entre os dois primeiros tempos, para cerca

de 7×10^{12} cel./L em 5 DPI. Depois desse ponto decresce progressivamente até 20 DPI onde a concentração média dos eritrócitos se situa em cerca de 3×10^{12} cel./L. Os animais tratados apresentam em 0 DPI mais 10^{12} eritrócitos por litro de sangue que os controlos, situação que se repete em 5 DPI com a concentração média a assumir um valor próximo de 8×10^{12} cel./L. Nos dois pontos seguintes, 8 DPI e 13 DPI, assiste-se à diminuição para valores próximos de 4×10^{12} cel./L para, e aqui diferem da evolução do grupo controlo, apresentarem uma concentração de hemácias muito próxima da inicial: 5×10^{12} cel./L.

No que diz respeito ao hematócrito (Gráfico 3.5), a arquitectura da sua representação gráfica é idêntica ao comportamento da concentração de eritrócitos. Para G1 após um volume de 20% de hemácias no sangue total, em 0 DPI, existe um ganho de 9% para 5 DPI decrescendo a partir desse ponto até 20 DPI, onde se situa o mínimo absoluto da distribuição: cerca de 13%, valor que representa menos 7% que o hematócrito do início da experiência para este grupo. Partindo de um valor médio de 23%, o hematócrito dos animais tratados com minociclina aumenta 10 pontos percentuais em 5 DPI. Depois disso decresce progressivamente até 13 DPI, com valores que parecem não muito díspares face aos controlos.

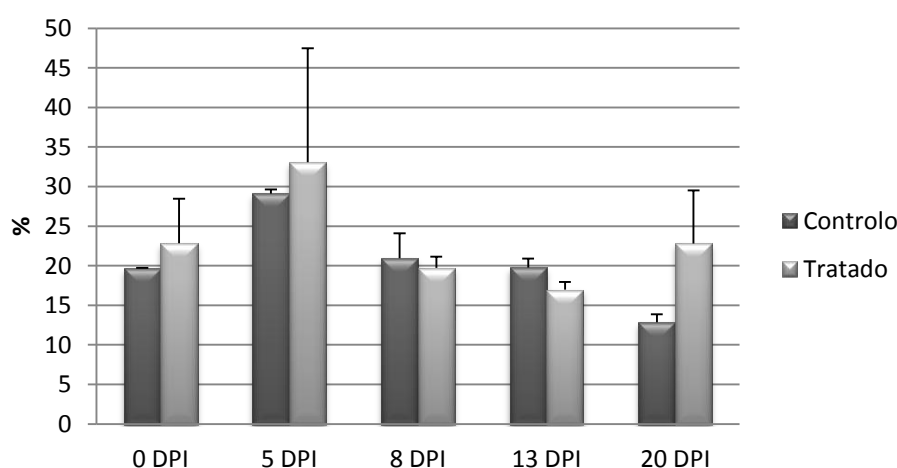


Gráfico 3.5 – Hematócrito dos animais sacrificados. O volume ocupado pelos eritrócitos no total da amostra assume valores mais elevados para os controlos em 8 DPI e 13 DPI. Em 0 DPI, 5 DPI e 20 DPI são os tratados com maior percentagem de eritrócitos na relação com os restantes constituintes do sangue.

No último tempo, 20 dias pós infecção, o hematócrito aumenta 6% face ao tempo imediatamente anterior, para se situar nos 23%, valor idêntico a 0 DPI.

Outro dado fornecido pelo hemograma diz respeito à hemoglobina (gráfico 3.6). Este gráfico é muito similar aos anteriores, concentração de eritrócitos e hematócrito, na variação ao longo do tempo.

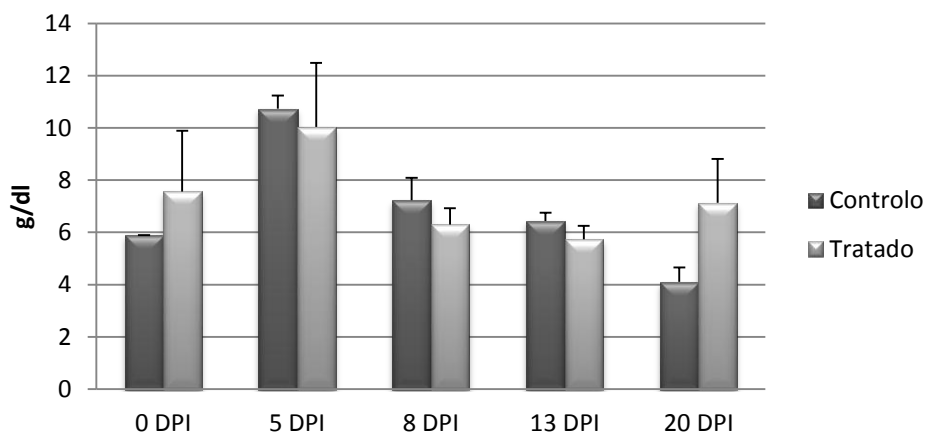


Gráfico 3.6 - Concentração de Hemoglobina. Representação das variações nas quantidades de hemoglobina presente no sangue dos animais. Gráfico sobreponível à evolução da concentração de eritrócitos e do hematócrito, excepto em 5 DPI, onde ao contrário dos restantes gráficos, o valor é maior no grupo controlo.

O comportamento das concentrações de hemoglobina dentro dos dois grupos e a relação entre eles sobrepõe-se em quase todos os pontos. Excepção feita a 5 DPI onde essa sobreposição não é possível dado que a hemoglobina é em maior quantidade no grupo controlo. Tal não acontece nos gráficos 3.4 e 3.5, onde existem barras aparentemente com maior área para os valores obtidos em 5 DPI para o grupo tratado, seja a concentração eritrocitária ou o hematócrito.

Diferindo dos gráficos para as concentrações de eritrócitos, hemoglobina total e hematócrito, os valores das quantidades de hemoglobina por eritrócito (gráfico 3.7) dão outra perspectiva da distribuição desta proteína. Em 0 DPI o valor para os dois grupos é idêntico e corresponde a cerca de 15 pg, com maior dispersão dos valores dos tratados, traduzido por um desvio-padrão superior. Em 5 DPI a quantidade de hemoglobina associada por eritrócito nos murganhos tratados é de cerca de 2 pg inferior aos controlos,

situando-se nos 13 pg. Depois daquele ponto, observa-se uma possível “recuperação” dos tratados ao longo do tempo, com progressão inversa na hemoglobina nos controlos. Em 20 DPI a quantidade de hemoglobina corpuscular média nos tratados é superior à dos tratados 0,7 pg, situando-se nos 14,9 pg.

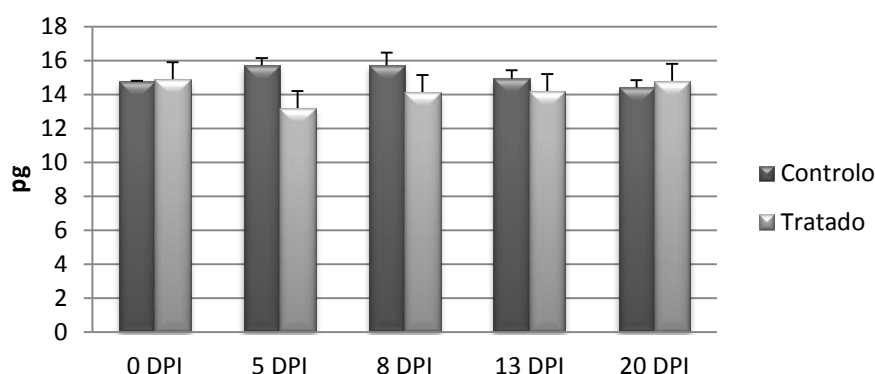


Gráfico 3.7 - Hemoglobina corpuscular média dos animais sacrificados. Verifica-se um decréscimo nos animais controlos, após aumentar em 0 DPI e 5 DPI, situação inversa dos resultados dos animais tratados.

3.2.3 - Leucograma

O gráfico 3.8 esquematiza as concentrações de leucócitos. Após 0 DPI em que os grupos apresentam um valor semelhante deste tipo de células 10^9 cel./L, assiste-se em 5 DPI a uma concentração nos controlos de quase o triplo do valor médio encontrado nos tratados, isto é, cerca de 9×10^9 cel./L. Em 8 DPI, com a redução de leucócitos a acontecer em ambos os grupos face a 5 DPI, a diferença entre os valores encontrados nas duas linhas do gráfico é de aproximadamente 5×10^9 cel./L, com os tratados a possuir menos 3,5x leucócitos que os controlos (2×10^9 cel./L). Em 13 DPI há um aproximar do valor médio dos leucócitos de G1 aos de G2, com a descida dos primeiros para cerca de 3×10^9 cel./L enquanto os tratados mantêm o seu valor de 8 DPI: aproximadamente 2×10^9 . Nos últimos animais, amostras de 20 DPI, pela primeira vez os glóbulos brancos são em maior concentração no grupo a que foi administrado o antibiótico. Proporção-

nalmente os controlos apresentam uma concentração de $1,5 \times 10^9$, valor menos de metade do encontrado no animais de G2: $3,4 \times 10^9$ cel./L.

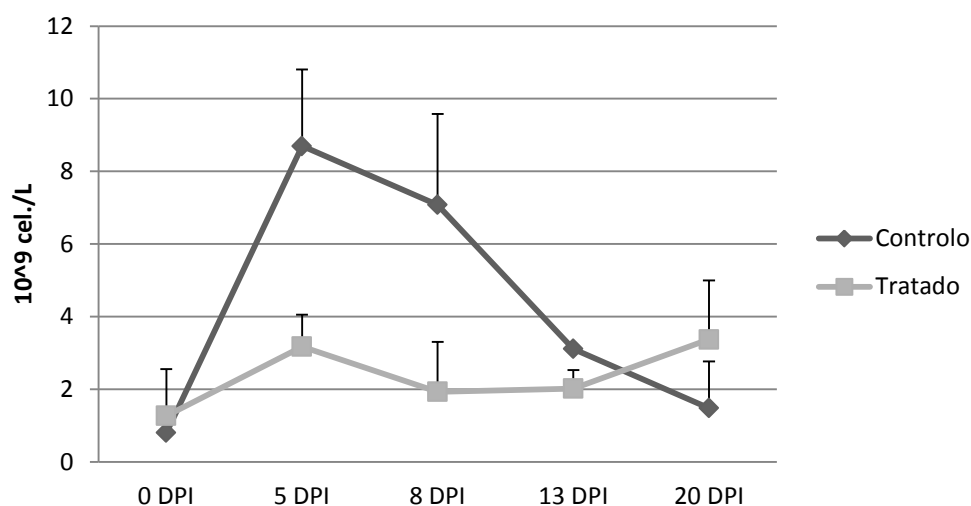


Gráfico 3.8 - Concentração dos leucócitos dos animais sacrificados. Os leucócitos apresentam menor amplitude no grupo tratado e concentrações entre 5 DPI e 13 DPI mais expressivas nos controlos.

Observando a percentagem dos linfócitos quando em relação com o total de leucócitos (gráfico 3.9) verifica-se que no dia da infecção e dois dias após o início do tratamento a

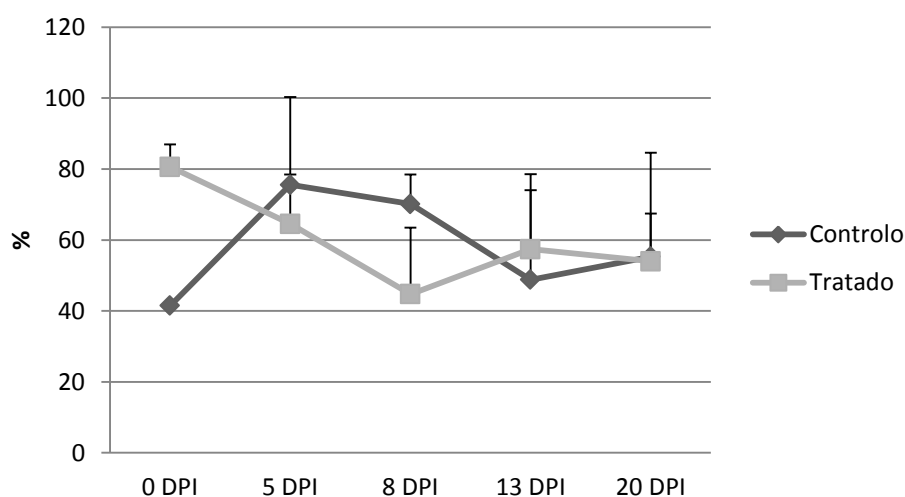


Gráfico 3.9 – Percentagem de Linfócitos no total de leucócitos nos animais sacrificados. Partindo de valores muito diferentes em 0 DPI, os linfócitos apresentam-se em semelhante proporção nos animais sacrificados de ambos os grupos, em 20 DPI.

G2, estes apresentam uma percentagem que ronda o dobro da proporção de leucócitos de G1. A situação acaba por se inverter em 5 DPI, ainda que com uma diferença de cerca de 11% a mais para os controlos. A proporção linfocitária nos *Mus musculus* tratados atinge o seu mínimo absoluto no ponto seguinte (8 DPI) para aumentar e voltar a decrescer ligeiramente em 13 DPI e 20 DPI, respectivamente. Ainda no mesmo gráfico, a média dos linfócitos nos controlos atinge a segunda percentagem mais elevada de diferença face aos restantes em 8 DPI, cerca de 25%. De realçar que, no último ponto do gráfico, as percentagens de ambos os grupos são idênticas, com mais ou menos 55% de representatividade.

Outra linha de células a incluir nos resultados do leucograma é a contagem dos granulócitos que inclui neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Como se pode ver no gráfico 3.10, os valores são ascendentes e semelhantes entre os grupos em 0 DPI e 5 DPI, com uma marcada diferença em 13 DPI, cerca de 1×10^9 células por litro de sangue a mais para os controlos que os tratados. A partir desse ponto a concentração dos granulócitos nos animais controlos descem para níveis, em 20 DPI, semelhantes aos iniciais, isto é aprox. $3,3 \times 10^8$ cels./L. Já no grupo tratado surge, também no vigésimo dia de infecção, uma subida para $1,07 \times 10^9$ cel./L, superando o valor médio dos controlos.

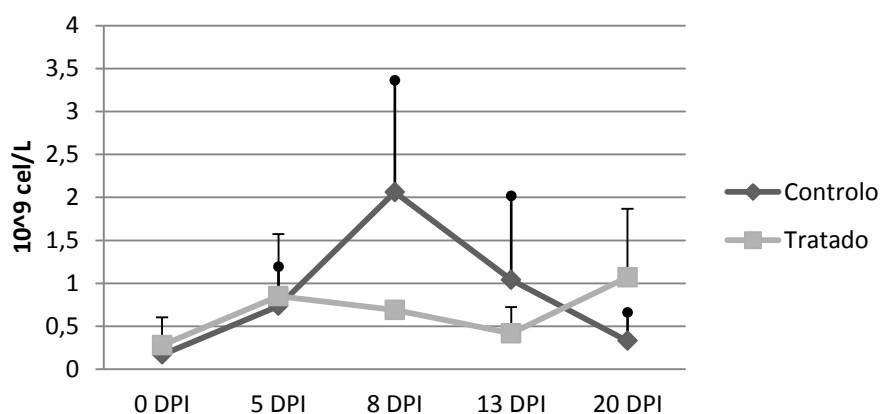


Gráfico 3.10 - Concentração dos granulócitos nos animais sacrificados. Subida muito acentuada em G1 até 8 DPI para decrescer para valores próximos dos iniciais em 20 DPI. Verifica-se menor amplitude de variação dos tratados, com um valor médio superior aos controlos só em 20 DPI.

3.3 - IL-4, INF- γ e Óxido Nítrico séricos

Na continuação dos resultados hematológicos alcançados, pretendeu-se saber quais as quantidades de óxido nítrico, de IL-4 e IFN- γ presentes em amostras de soro. No gráfico 3.11 verifica-se que nos dois conjuntos se assiste a um decréscimo dos valores de óxido nítrico de 0 DPI para 5 DPI, mais acentuado para os controlos que perdem cerca de 6,5 pg em termos médios, contra aproximadamente 1 pg de diferença encontrada entre estes dois tempos nos valores de G2. A partir desse ponto assiste-se à subida gradual do parâmetro nos animais controlos até 20 DPI (4,9 pg). Nos animais tratados, 8 DPI corresponde ao máximo absoluto e a 14,39 pg (aproximadamente o dobro do valor de 5 DPI), para diminuir em 13 DPI para cerca de 6 pg e possuir novo declive positivo na aproximação a 20 DPI. Analisando exclusivamente o primeiro e o último ponto, os valores de NO de G1 sofreram uma diminuição média de 4,30 pg, contra 1,7 pg de aumento para G2.

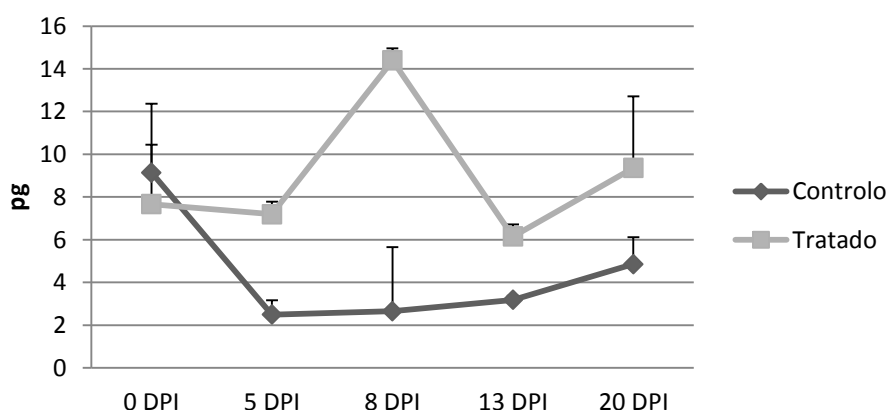


Gráfico 3.11 – Óxido Nítrico sérico nos animais sacrificados. Os valores aparentam uma diferença de quantidades após 5 DPI em ambos os grupos, com valores superiores nos animais tratados.

Como mostra o gráfico 3.12, as quantidades médias de IL-4 em 0 DPI são semelhantes entre os grupos, aumentando também em simultâneo em 5 DPI. A primeira diferença surge em 8 DPI donde parece existir uma secreção mais elevada esta citocina no grupo tratado com uma concentração próxima de 0,15 pg/ml enquanto o grupo controlo não ultrapassa as 0,1 pg/ml de IL-4. No décimo terceiro dia pós infecção, o valor para o

grupo controle mantém-se semelhante ao anterior e assiste-se à diminuição da presença de IL-4 para cerca de 0,09 pg/ml nos G2. Obtiveram-se resultados quase nulos em ambos os grupos para 20 DPI.

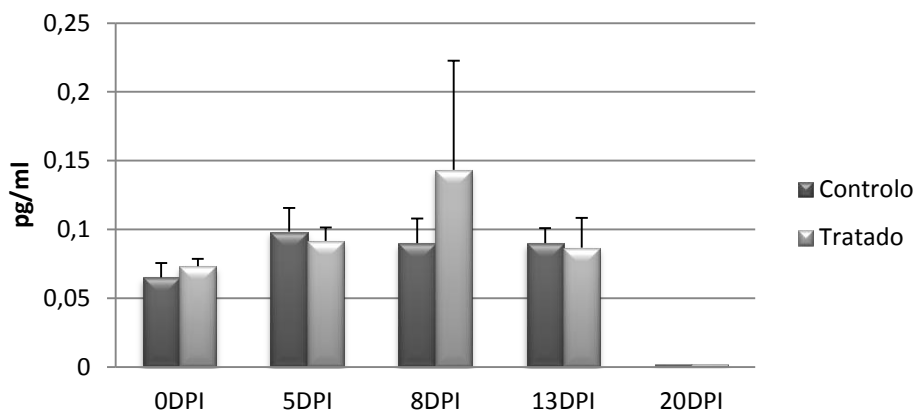


Gráfico 3.12- Concentração de IL-4 sérica nos animais sacrificados. Após concentrações iniciais com a diferença de 7×10^{-3} pg/ml e de um máximo em 8 DPI para os tratados, os resultados obtidos em 20DPI são muito próximos de zero.

Para o IFN- γ (gráfico 3.13) obtiveram-se concentrações com ordem de grandeza superior àquelas encontradas para IL-4. Partindo de valores semelhantes para os dois grupos em 0 DPI (cerca de 0,19 pg/ml), a expressão média desta citocina aumenta em 5 DPI, também nos dois conjuntos, para cerca de 1 pg /ml. Atinge-se a secreção máxima de IFN- γ em 8 DPI próximo de 2 pg/ml, um pouco menos do dobro da concentração existente nos animais tratados: 1,14.

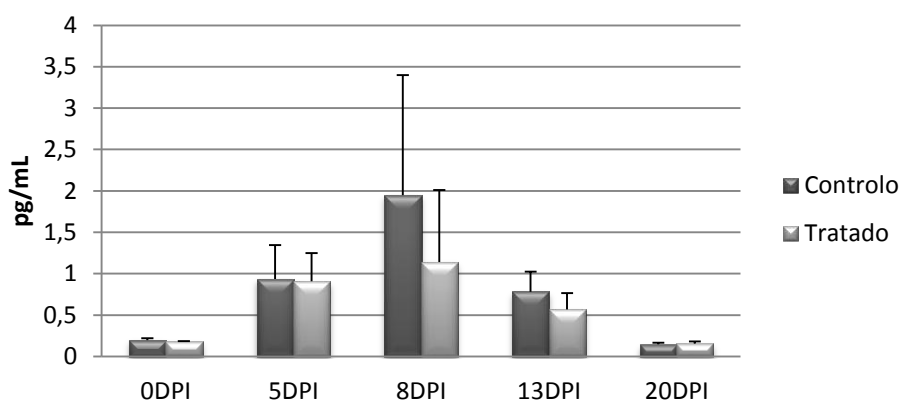


Gráfico 3.13 - Concentração de IFN- γ sérico nos animais sacrificados. Aparentemente, a maior discrepância é visualizada em 8 DPI, com uma distribuição relativamente simétrica dos valores face a esse ponto.

Em 13 DPI as concentrações encontradas em ambos os grupos descem aparentemente (G1: 0,78 pg/ml e G2: 0,56 pg/ml), para decrescer novamente e apresentar em 20 DPI valores a rondar os 0,15 pg/ml, inclusivamente inferiores aos iniciais.

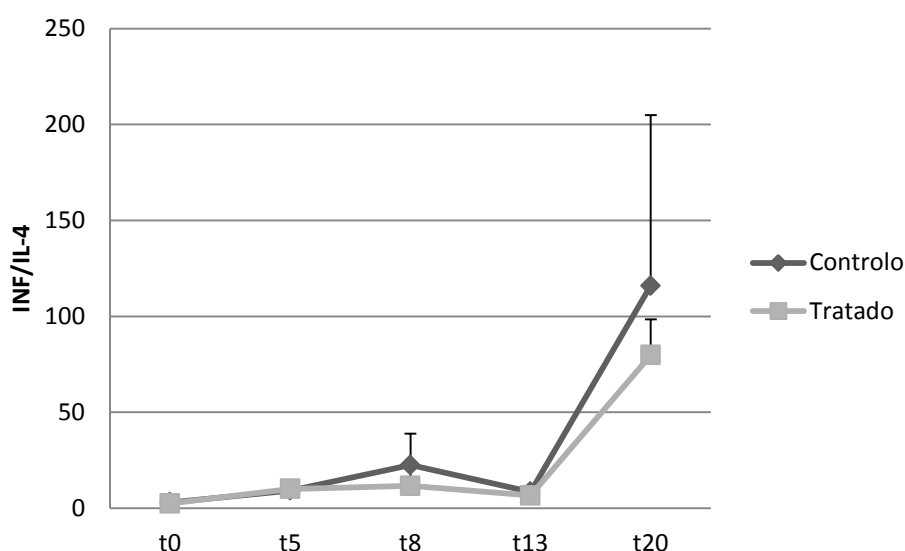


Gráfico 3.14 – Relação proporcional entre os perfis Th1 e Th2. Relação entre a secreção de IFN- γ e IL-4 pelos dois grupos de animais com o predomínio de uma resposta inflamatória do tipo I.

A proporção da razão entre as respostas tipo I (representada pela produção de IFN- γ) e uma resposta tipo II (representada pela produção de IL-4) é estabelecida no gráfico 3.14. Em 0 DPI a secreção da citocina pró-inflamatória é 3.1x superior à produção de IL-4 nos controlos e 2,5x nos tratados. No tempo seguinte, 5 DPI, a relação é semelhante entre os dois grupos, com o IFN- γ a ser produzido em média 10x mais que a citocina anti-inflamatória. Em 8 DPI assiste-se à primeira aparente diferença entre os grupos, com a razão nos tratados a manter-se a favor do perfil pró-inflamatório, cerca de 1:11 (próximo do valor de 5 DPI) e nos controlos a surgir uma relação entre as citocinas de mais do dobro face ao tempo anterior, isto é, 1:22. Em 13 DPI a razão da secreção dos dois mediadores assume proporções mais baixas 1:8,6 para os controlos e 1:6,7 o que se aproxima, pelo limite inferior, dos números adstritos a 5 DPI. No último ponto tem-se a maior desproporção em termos de secreção dos dois mediadores, com o IFN- γ

a ser produzido em média cerca de 116x mais que a IL-4 nos controlos e aproximadamente 80x nos tratados.

3.4 - Anticorpos anti-*T.b. brucei*

Nas classes de imunoglobulinas analisadas encontram-se as IgM anti-*T.b.brucei* (gráfico 3.15). Conseguiu-se a detecção de anticorpos anti-*T.b.brucei* após 5 DPI com um título próximo de 2. A resposta humoral com estes anticorpos atinge valores aparentemente mais expressivos a partir de 8 DPI. Nessa altura as concentrações parecem ser mais do dobro das encontradas no ponto anterior, com a média mais elevada nos animais controlos. Em 13 DPI, sensivelmente na mesma proporção, descem ambos os valores face a 8 DPI e em 20 DPI assiste-se a uma inversão parcial desta tendência: os animais controlos exibem declive decrescente e existe um aparente aumento da área da barra do gráfico, nos tratados, quando comparado com a barra de 13 DPI.

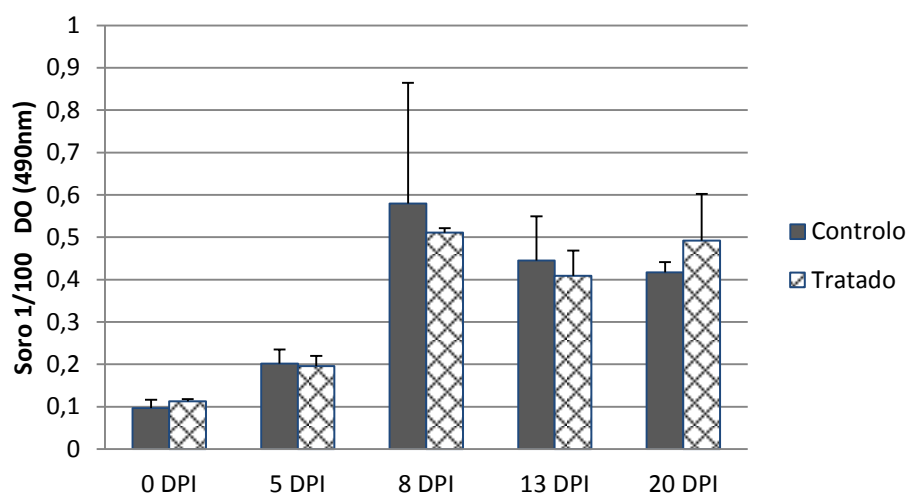


Gráfico 3.15 - IgM total anti-*T.b.brucei*. Marcado aumento da imunoglobulina M anti-tripanosossoma a partir de 8 DPI, decrescendo ligeiramente nos pontos seguintes.

No gráfico 3.16 representam-se os títulos de anticorpos relativos à IgG anti-*T.b.brucei*. É a partir de 8 DPI que a presença deste título de imunoglobulinas é mais relevante. Os títulos de anticorpos IgG anti-Tb são formados durante a infecção e atingem o pico máximo no ponto 20 DPI para os animais tratados. Neste tempo, parece

existir quase o dobro da secreção deste anticorpo quando comparado com o grupo controle.

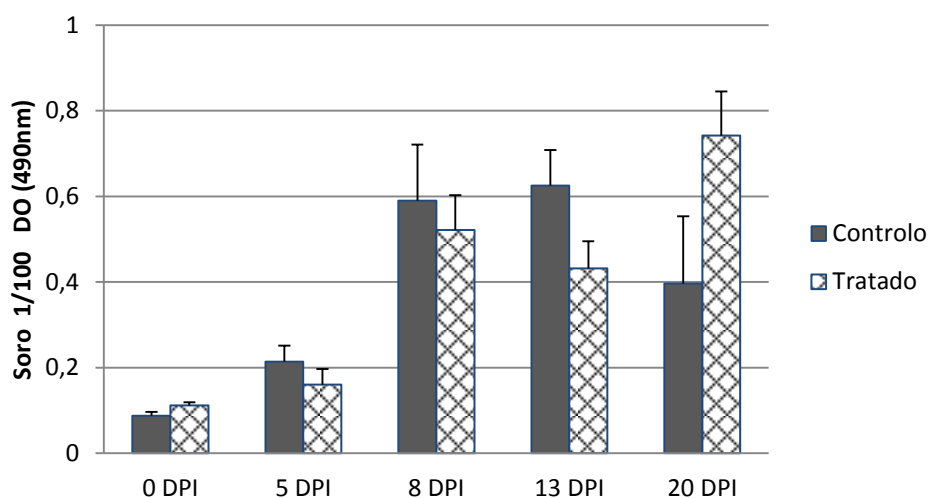


Gráfico 3.16 - IgG total anti-*T.b.brucei*. É aparentemente notória a semelhança entre o comportamento deste tipo de imunoglobulinas e a resposta humoral com anticorpos IgM.

O comportamento das concentrações de IgG é análogo à representação gráfica das IgM, mas com aparentes diferenças mais acentuadas na proporção entre ambos os grupos nos valores de 13 DPI e de 20 DPI. Note-se a possível diferença na tendência geral das titulações entre controles e tratados: os primeiros apresentam-se crescentes até 13 DPI onde se situa o seu máximo absoluto para assumir tendência decrescente até 20 DPI. Os animais tratados possuem um comportamento inicial crescente e, após um mínimo relativo em 13 DPI, em 20 DPI assumem o maior valor médio de todo o gráfico, para a concentração de IgG total.

As concentrações das subclasses de IgG específicas anti-tripanosossoma incluídas no estudo estão ilustradas no gráfico 3.18. Os anticorpos IgG1, IgG2a e IgG3 (Gráfico 3.17), parecem apresentar percentagens diferentes no contributo para a titulação obtida para IgG total. Aparentemente existem em maior quantidade as IgG2a e IgG3 que propriamente IgG1. Em 0 DPI e 5 DPI as quantidades das três formas de IgG não são discrepantes entre si quer dentro do grupo, quer entre os dois conjuntos de animais. A titulação para IgG1 é transversal a todas as amostras em ambos os grupos deste 0 DPI a 20 DPI (aproximadamente 0,05).

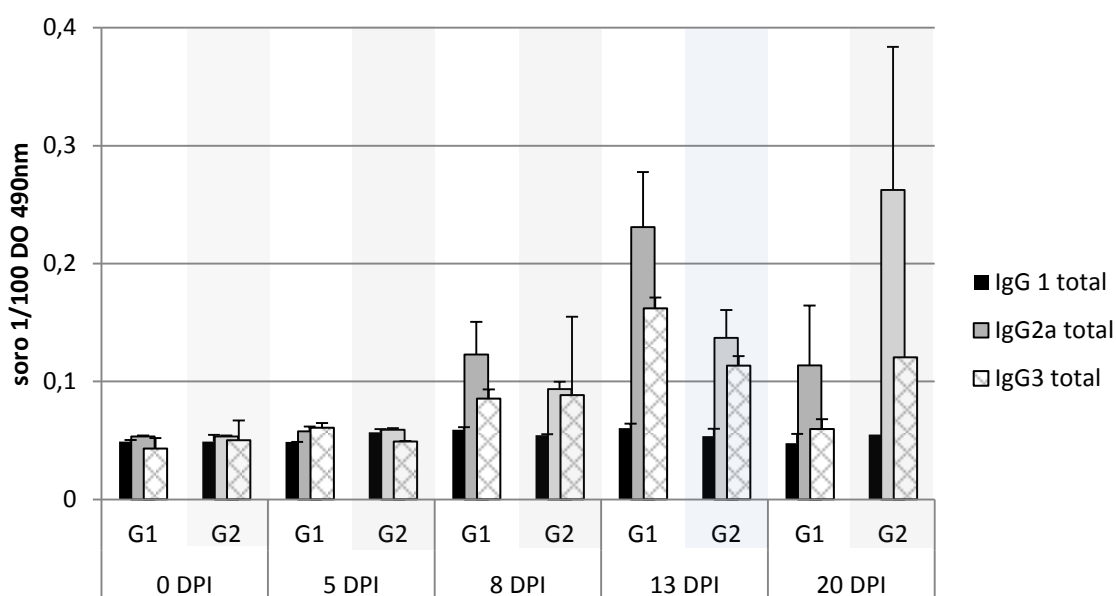


Gráfico 3.17 - Subclasses de IgG específicas para *T.b.brucei*. Existe um aparente predomínio da titulação de IgG2a e IgG3 no grupo controlo em 13 DPI, situação que se inverte em 20 DPI onde parece haver maior secreção desses dois anticorpos, associados ao grupo tratado.

Para o anticorpo IgG2a parece existir um aumento substancial em 8 DPI, mais para os controlos que para os tratados. A tendência crescente mantém-se em 13 DPI onde se atinge o pico máximo deste anticorpo para G1. Em 20 DPI dá-se a inversão dos valores entre os grupos, com a presença de IgG2a a ser menor que no ponto anterior dos controlos e a atingir o pico máximo, de todo o gráfico, nos tratados. Para a IgG3 nos animais controlos há uma distribuição simétrica em torno de 13 DPI, onde se encontra o máximo, com valores que parecem moderadamente inferiores em 8 DPI e 20 DPI. Tal não se verifica nos tratados em que a tendência é continuamente crescente a partir de 8 DPI mas com declive pouco acentuado entre 13 DPI e 20 DPI.

3.5 - Metaloproteínas com acção sobre gelatina bovina

Pretende-se investigar se o padrão de secreção das metaloproteínas com acção sobre o substrato é similar nos dois tipos de tecido e entre os grupos controlo e tratado.

As equações das rectas de calibração foram calculadas com vista à obtenção de $R^2 > 0,97$, para tornar fiáveis as concentrações de proteína total calculadas. Como resultado da optimização das zimografias, chegou-se às quantidades aplicadas de proteína, tendo em consideração a diluição adequada e o volume final de 10 µl/poço.

Pelo reduzido número de amostras, não é possível trabalhar os dados em termos estatísticos, com p a assumir o valor 0. Apesar disso, as concentrações encontram-se discriminadas na tabela 3.3 onde está patente que o valor médio é relativamente variável de ponto para ponto consoante o tipo de tecido. Os desvios-padrão variam de 0,52 a 2,90 ng podendo considerar-se que a dispersão das quantidades aplicadas de proteína total de fígado ou de baço, quer dos controlos quer dos tratados, não se encontram muito distantes da média. A amplitude da variação que existe entre o maior e o menor valores das médias dos fígados de 0 DPI, 8 DPI e 20 DPI é de 2,09 ng assim como para os baços é de 0,92 ng, o que permite com alguma segurança afirmar que é possível uma comparação entre estes três pontos.

	t0		t5		t8		t13		t20	
	Fígado	Baço	Fígado	Baço	Fígado	Baço	Fígado	Baço	Fígado	Baço
Controlos	6,78	7,57	2,98	1,27	10,00	6,27	1,89	0,71	9,47	6,61
	7,54	7,94	3,15	2,68	8,38	6,17	4,85	3,18	5,36	7,48
	9,10	9,34	3,63	3,00	11,93	6,23	5,29	2,77	10,38	13,17
Tratados	9,02	7,47	3,95	2,01	9,22	6,06	2,51	2,29	11,67	6,97
	7,82	7,36	4,31	2,32	10,43	6,59	4,88	3,36	9,78	5,04
	8,12	7,40	3,22	2,21	10,96	10,24	3,86	1,99	10,43	5,81
Média	8,06	7,85	3,54	2,25	10,15	6,93	3,88	2,38	9,52	7,51
Desv. Pad	0,89	0,76	0,52	0,60	1,26	1,63	1,40	0,97	2,17	2,90

Tabela 3.2 - Quantidade real de proteína, em ng, de cada amostra aplicada por poço. Os valores médios de proteína aplicada são discrepantes de ponto para ponto, contudo os desvios-padrão revelam pequena variabilidade dentro das amostras do mesmo tipo de tecido. O maior desvio-padrão é encontrado no conjunto dos baços em 20 DPI com o valor de 2.90 ng.

Para os pontos 5 DPI e 13 DPI e porque foi necessária uma diluição superior são comparáveis entre si por apresentarem quantidades semelhantes de proteína aplicada, com médias e desvios-padrão também idênticos para o mesmo tipo de tecido. As diferenças de diluição ficaram a dever-se a que nos géis com amostras de tecidos recolhidos cinco e treze dias pós infecção, diluídas 8x, existia grande arrastamento da degradação da gelatina, daí a necessidade de se recorrer à diluição de 20x. Por sua vez as amostras

de 0 DPI, 8 DPI e 20 DPI formaram bandas bem definidas na degradação da gelatina com a diluição de 1:8 pelo que não se repetiu com uma diluição superior sob o risco de perda de actividade enzimática. Para facilitar a comparação da intensidade das bandas e o posicionamento das mesmas, os géis de acrilamida foram decompostos dando origem a duas tabelas exibidas nas figuras 3.1 (pag. 66) e 3.2 (pag. 68). Mostram-se desta forma os resultados para a degradação do substrato pelas metaloproteinases nas amostras de fígado e baço, respectivamente.

Em 0 DPI, para os géis exibindo amostras de fígado, são encontradas bandas à altura de ± 80 kDa nos animais controlos e tratados. Surgem outras bandas como resultado da degradação da gelatina correspondentes a proteínas com ± 10 kDa também em murganhos de ambos os grupos. Volvidos dois dias de tratamento não parece existir diferença no padrão de degradação da gelatina com as bandas a surgirem a alturas e com intensidades similares em ambos os grupos. Em 5 DPI nos fígados de todos os animais controlos e tratados estão presentes bandas à altura de ± 40 kDa. A amostra D é aquela que demonstra a reacção mais extensa, mesmo quando comparada com os controlos.

Nos resultados de 8 DPI pode ser notada nos animais controlos e tratados a degradação muito intensa da gelatina à mesma altura do ponto anterior, ± 40 kDa. Imediatamente abaixo destas, surgem outras mais ténues, mas ainda assim evidenciando a degradação da gelatina a ± 30 kDa. Tal situação ocorre nas amostras de oito dias pós infecção e no seu conjunto, os animais tratados aparentam maior quantidade de metaloproteinases a ± 30 kDa que os controlos, para bandas semelhantes de enzimas com $40 \pm$ kDa. Ainda é possível, em ambos os grupos, a observação de outro conjunto de bandas nos animais sete e oito, embora ténues, à altura de ± 20 kDa, surgindo também nos três animais tratados. Abaixo destas, a ± 18 kDa, existe uma banda de intensidade semelhante às anteriores na amostra I.

Atentando na representação do gel para 13 DPI mantém-se a degradação da gelatina bovina a ± 40 kDa nos animais controlos e a banda mais ténue, também encontrada em 8 DPI, imediatamente abaixo das primeiras. Nos tratados existe o mesmo padrão da acção sobre o substrato mas com a diferença de serem bandas mais esbatidas que as encontradas à altura de ± 40 kDa nos controlos.

Em 20 DPI e com amostras diluídas 8x, os controlos possuem bandas definidas, semelhantes em intensidade a 8 DPI em todos os animais à mesma altura de ± 40 kDa. A banda encontrada nas amostras anteriores a ± 30 kDa é visível apenas na amostra doze e encontra-se bem definida. O fígado correspondente à amostra número onze possui também pelo menos uma proteinase de ± 20 kDa com acção sobre a gelatina.

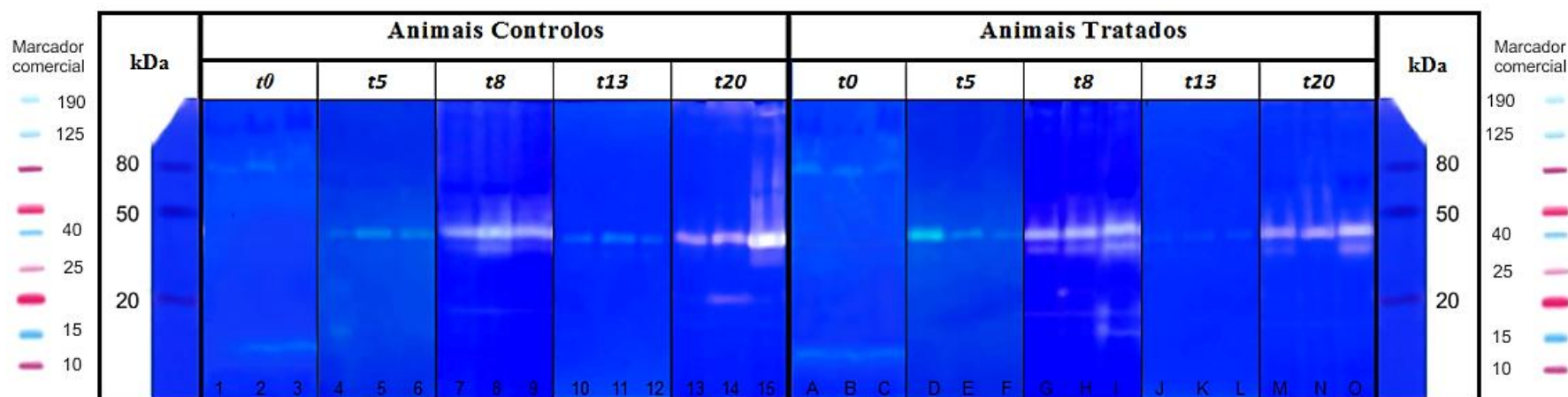


Figura 3.1 - Representação dos resultados obtidos por zimografia para as amostras de fígado. A actividade das metaloproteinases com acção sobre a gelatina é visível em 0 DPI com um padrão diferente dos restantes pontos. Aí encontram-se bandas à altura de ± 80 kDa em ambos os grupos, mas que desaparecem com o progredir da infecção. A partir de 5 DPI predomina a degradação por enzimas com peso de ± 40 kDa em todos os animais controlos e tratados surgindo, a partir de 8 DPI, bandas com ± 30 kDa em alguns dos murganhos de ambos os grupos, aparentemente mais evidentes nos animais tratados. Não obstante a diluição de 20x das amostras de 5 DPI e 8 DPI, são visíveis bandas à altura de 40 kDa, o que indica maior secreção enzimática, ou maior afinidade para o substrato nestes dois pontos.

A figura 3.2 que mostra os zimografias realizados com amostras de baço demonstra uma aparente maior actividade das metaloproteinases. Assim, para 0 DPI os animais controlos apresentam bandas ténues a ± 80 kDa em todos poços e um conjunto de bandas bem marcadas a ± 40 kDa seguidas de outras a ± 30 kDa também facilmente identificáveis. Em todas as amostras e para uma altura de cerca de 18 kDa surgem bandas pouco evidentes em todas as colunas. Nos animais submetidos à minociclina *p.o.* verifica-se o mesmo padrão que nos controlos, com a diferença de serem bandas mais intensas revelando maior actividade sobre a gelatina. As diferenças assinaláveis são que as bandas que se encontram a ± 18 kDa são mais definidas que as dos controlos e surgem, pela primeira vez, bandas altas com peso a rondar os 180-190 kDa em todas as amostras.

Para 5 DPI, as amostras quatro e cinco exibem as bandas altas e ténues identificadas pela primeira vez nos animais tratados no ponto de recolha anterior. Surge outra à altura de 120-130 kDa, ténue, também na amostra cinco e em todos a ± 60 kDa existe um grupo de bandas muito pouco definidas. O sistema de bandas a ± 40 e ± 30 kDa é preservado assim como a banda a cerca de 18 kDa no poço quatro. No grupo dos tratados surgem na amostra D duas bandas definidas a ± 190 e a ± 125 kDa e em todos os poços estão bandas com cerca de 60 kDa, estando adstrita à amostra F a banda mais intensa deste conjunto. Em linha com os géis anteriores, estão presentes as bandas de ± 40 kDa, bem definidas em todas as amostras.

Nas zimografias realizadas com tecido esplénico dos animais sacrificados oito dias decorridos de infecção, não existem alterações no padrão de degradação da gelatina com o sistema de dupla banda a ± 40 e ± 30 kDa a estar presente. É contudo muito mais extenso nos animais tratados que nos controlos. As bandas mais baixas, a ± 20 e ± 15 kDa não se encontram nos controlos mas sim nos tratados.

Em 13 DPI, quer nos controlos quer nos tratados, é notório o mesmo sistema entre ± 30 e ± 40 kDa, com intensidades semelhantes. Num animal de cada grupo, mais precisamente os poços 11 e K possuem as bandas altas já descritas, uma de ± 190 kDa e outra de ± 120 kDa.

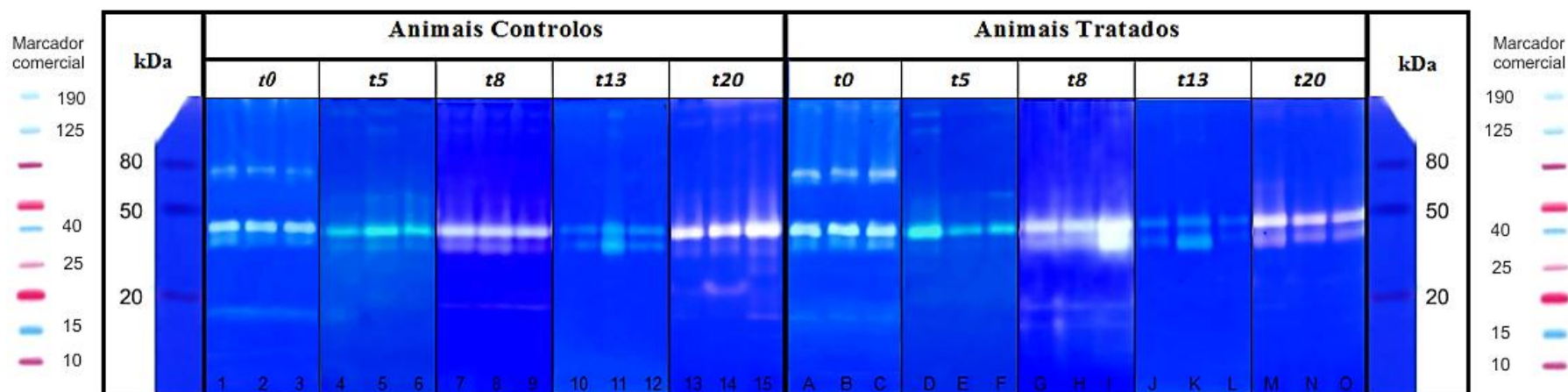


Figura 3.2 - Representação dos resultados obtidos por zimografia para as amostras de baço. As bandas relativas ao baço possuem maior degradação da gelatina quando comparadas com as amostras de fígado. Evidência em 0 DPI de bandas a ± 80 kDa em todos os animais assim como do sistema ± 40 kDa e ± 30 kDa quer nos controlos quer nos tratados de todos os animais ao longo dos cinco pontos de recolha, até 20 DPI. Surgem em algumas amostras bandas altas de ± 190 kDa e ± 120 kDa e outras baixas de menor massa molecular com ± 20 kDa e ± 18 kDa. Os animais controlos de 20 DPI são os que de todo o conjunto apresentam bandas mais variadas embora com fraca actividade, aludindo à secreção de metaloproteinases de diferentes tamanhos.

Por último, em 20 DPI existe nos controlos a maior variedade de bandas de todos os zimografias realizados. Estão presentes as bandas altas e esbatidas de ± 190 kDa e continua o sistema de degradação marcada a ± 40 e ± 30 kDa. Na amostra quinze surge uma banda ténue a ± 30 kDa, outra de intensidade similar está presente na amostra catorze acima dos 20 kDa. A um nível próximo do marcador para o peso de 20 kDa, as amostras treze e quinze exibem bandas parecidas entre si, muito esbatidas mas identificáveis. Relativamente aos animais tratados possuem também as bandas altas a ± 190 kDa, mas menos intensas que nos controlos, sendo quase imperceptíveis. Na linha dos restantes pontos, estão também presentes as bandas intensas e bem definidas no que respeita às massas moleculares de ± 40 kDa e ± 30 kDa.

3.6 - Optimização dos protocolos de PCR

Para a realização de PCR utilizou-se cDNA previamente sintetizado a partir de RNA total obtido das amostras conforme descrito no capítulo 2 - Materiais e Métodos. Os valores da razão das absorvâncias do RNA lidas a 260 nm pela absorvância das proteínas totais, lidas a 280nm oscilou entre 1,60 e 1,92 razões consideradas de elevado grau de pureza (valores tabelados em Anexo, pag. 103).

Pela morosidade da optimização dos protocolos para PCR, não foi possível a avaliação dos níveis de expressão génica utilizando esta técnica. Conseguiu-se a optimização do sistema que permite amplificar zonas específicas do RNA a serem utilizadas posteriormente para os ensaios de quantificação da expressão génica por PCR quantitativo, RT-PCR ou qPCR, da maioria dos mediadores e citocinas documentada através do surgimento de bandas à altura correcta, quando lidos à luz UV.

Com os *primers* utilizados conseguiu-se a amplificação de um conjunto de 348 pb de cDNA para a proteína β -actina em todas as amostras utilizadas, uma de um animal controlo e outra de um animal tratado escolhido aleatoriamente de todos os pontos de recolha. Os resultados constituem as figuras 3.3 e 3.4.

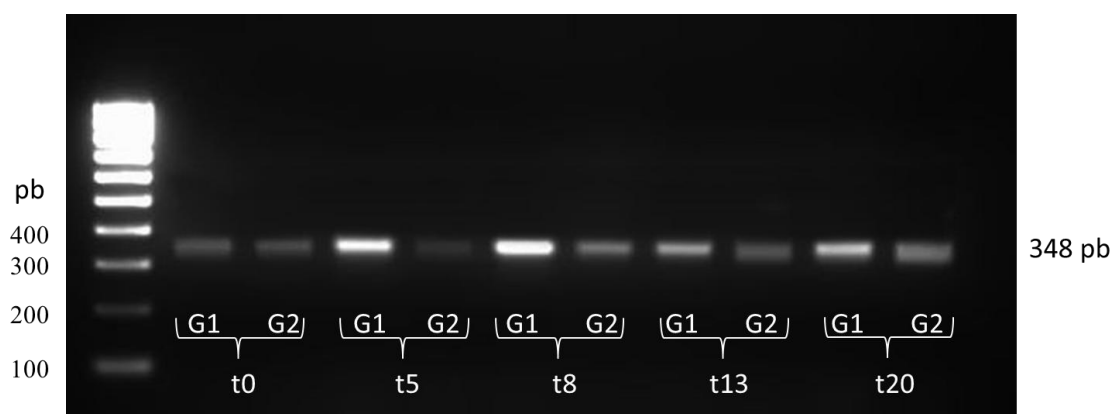


Figura 3.3 – Gel de agarose a 2% com amplificação de um fragmento de 348 pb para cDNA de β -actina em todas as amostras de fígado.

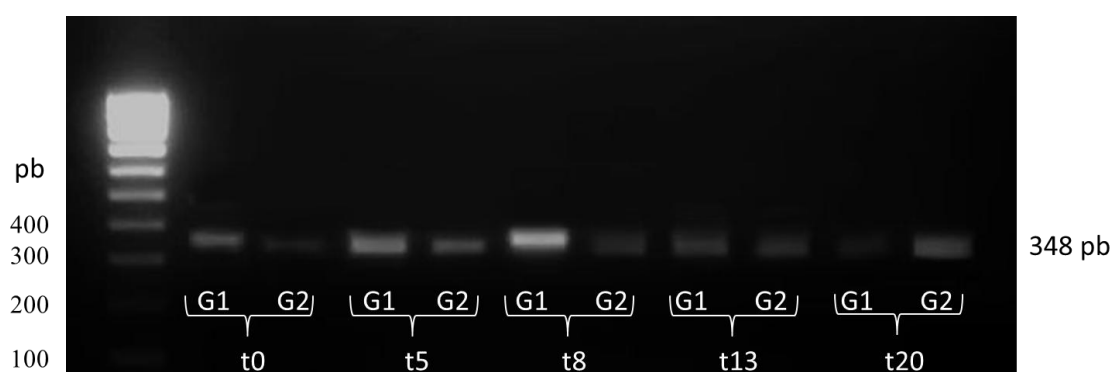


Figura 3.4 - Gel de agarose a 2% com amplificação de um fragmento de 348 pb para cDNA de β -actina em todas as amostras de baço.

Devido ao sucesso da PCR com o controlo positivo, seguiu-se a optimização dos protocolos para os mediadores inflamatórios. Conseguiu-se a amplificação para as interleucinas - 2 (fig. 3.5 e 3.6), - 6 (fig. 3.7 e 3.8), IFN- γ (fig. 3.9 e 3.10), TNF- α (fig. 3.11 e 3.12), MMP-2 (fig. 3.13 e 3.14), MMP-9 (fig. 3.15 e 3.16) e MMP-12 (fig. 3.17 e 3.18) em amostras de fígado e de baço. Com estes resultados pretende-se a posterior realização de PCR com amostras de todos os murganhos para a comparação da intensidade das bandas quer entre os animais do mesmo grupo quer entre os grupos ao longo dos pontos de recolha.

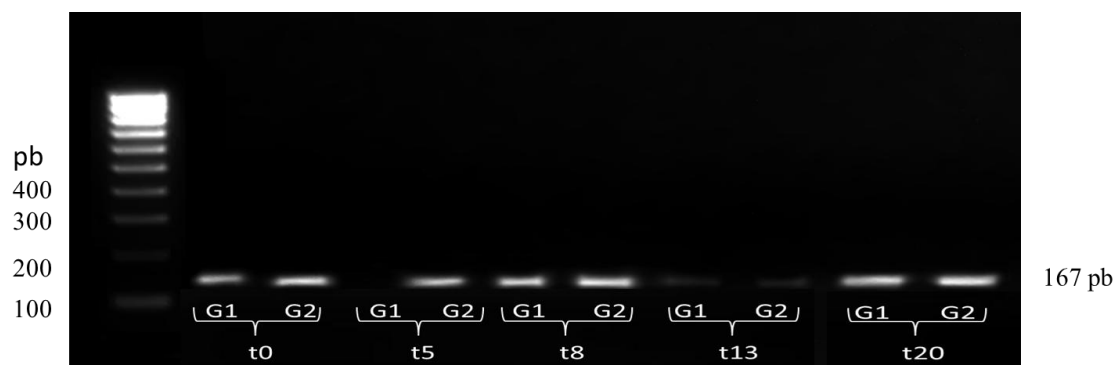


Figura 3.5- Gel de agarose a 2% com amplificação de um fragmento de 167 pb para cDNA de IL-2 nas amostras de fígado.

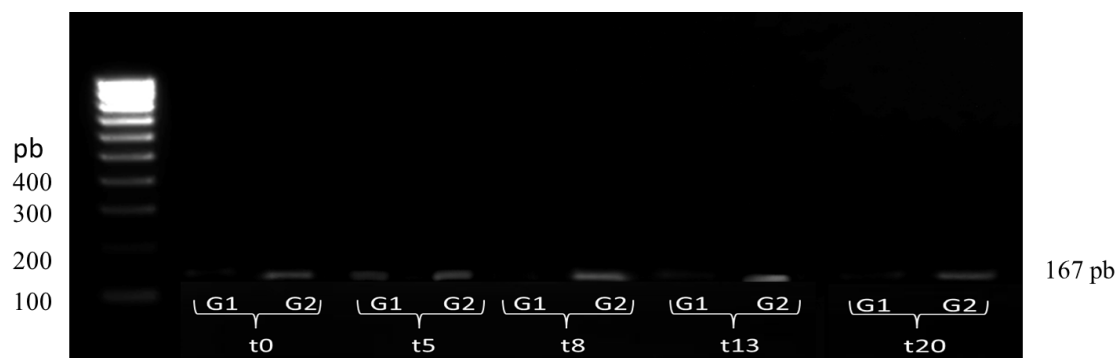


Figura 3.6 - Gel de agarose a 2% com amplificação de um fragmento de 167 pb para cDNA de IL-2 nas amostras de baço.

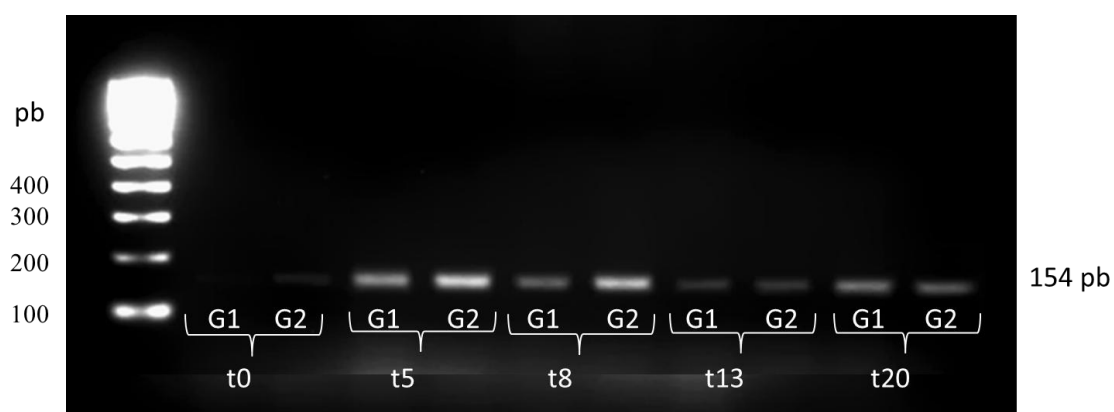


Figura 3.7 - Gel de agarose a 2% com amplificação de um fragmento de 154 pb para cDNA de IL-6 nas amostras de fígado.

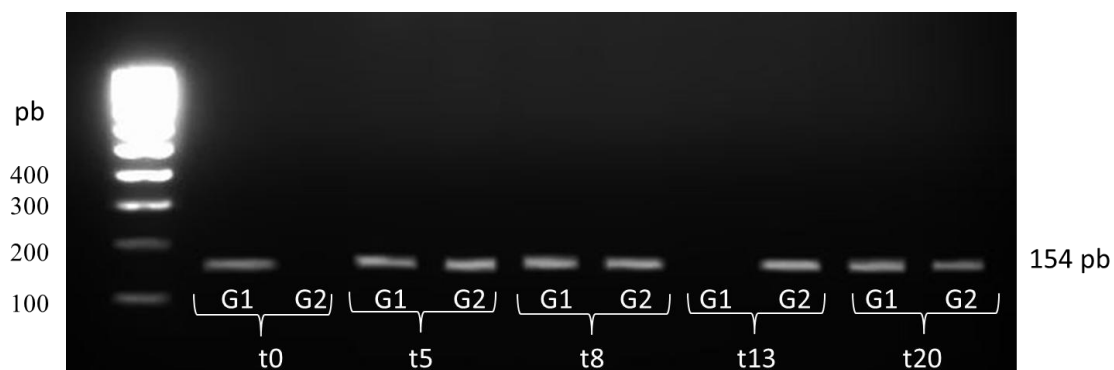


Figura 3.8 - Gel de agarose a 2% com amplificação de um fragmento de 154 pb para cDNA de IL-6 nas amostras de baço.

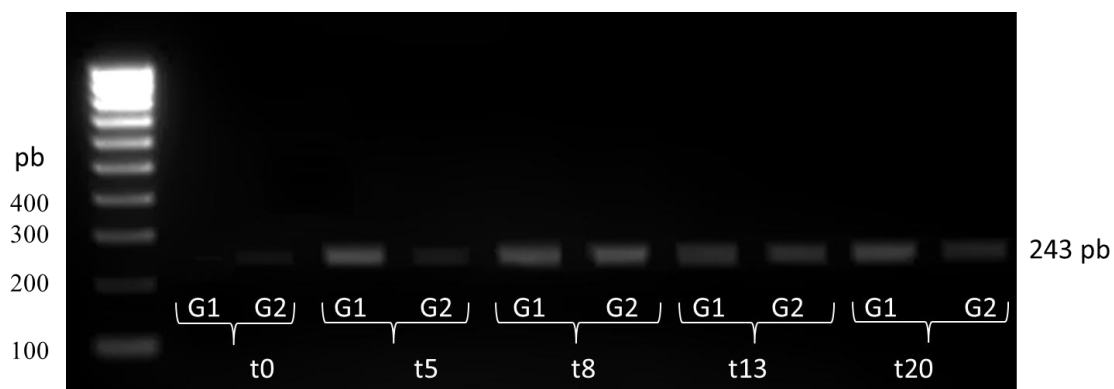


Figura 3.9 - Gel de agarose com amplificação de um fragmento de 243 pb para cDNA de INF- γ nas amostras de fígado.

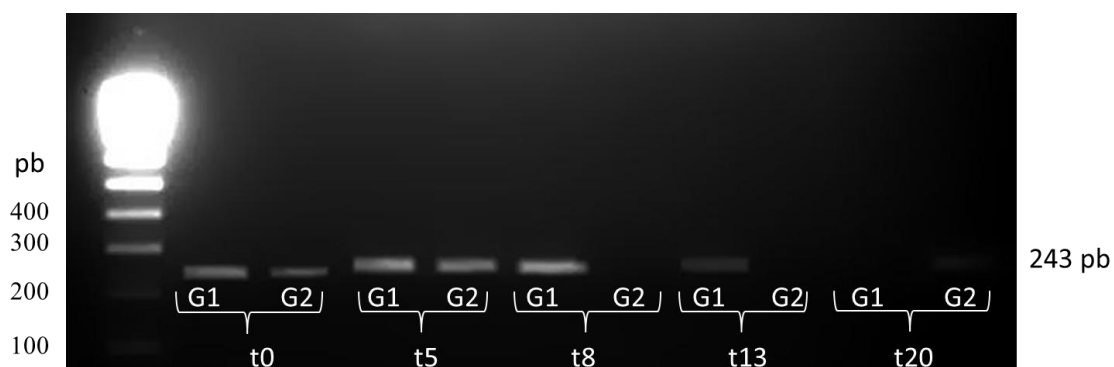


Figura 3.10 - Gel de agarose a 2% com amplificação de um fragmento de 243 pb para cDNA de IFN- γ nas amostras de baço.

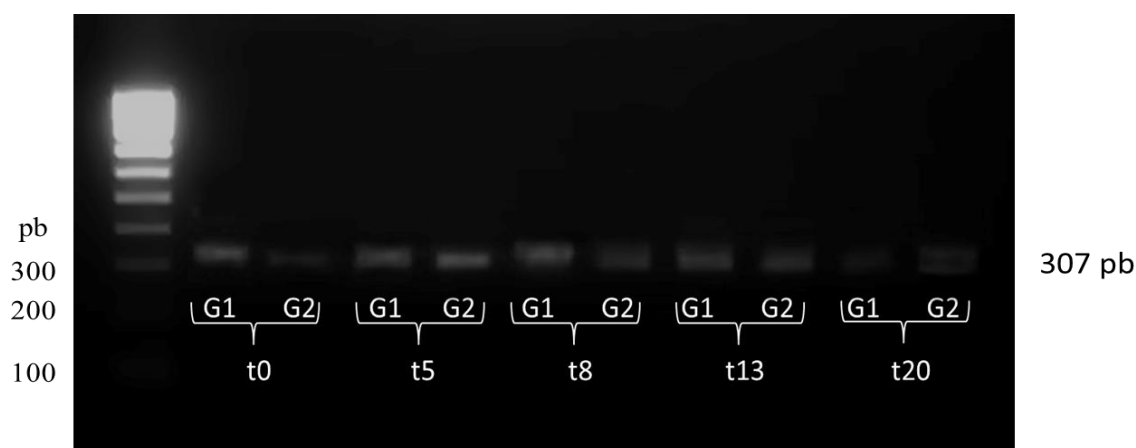


Figura 3.11 - Gel de agarose a 2% com amplificação de um fragmento de 307 pb para cDNA de TNF- α nas amostras de fígado.

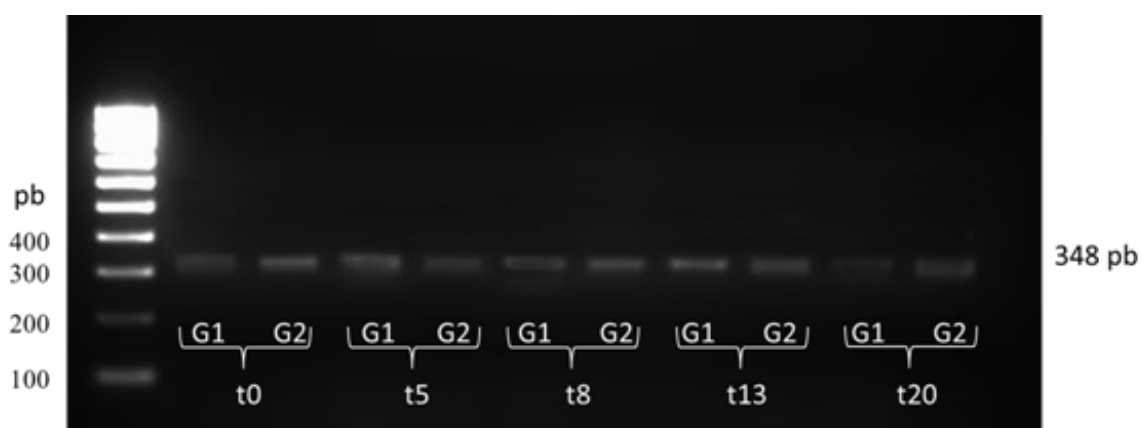


Figura 3.12 - Gel de agarose a 2% com amplificação de um fragmento de 348 pb para cDNA de TNF- α nas amostras de baço.

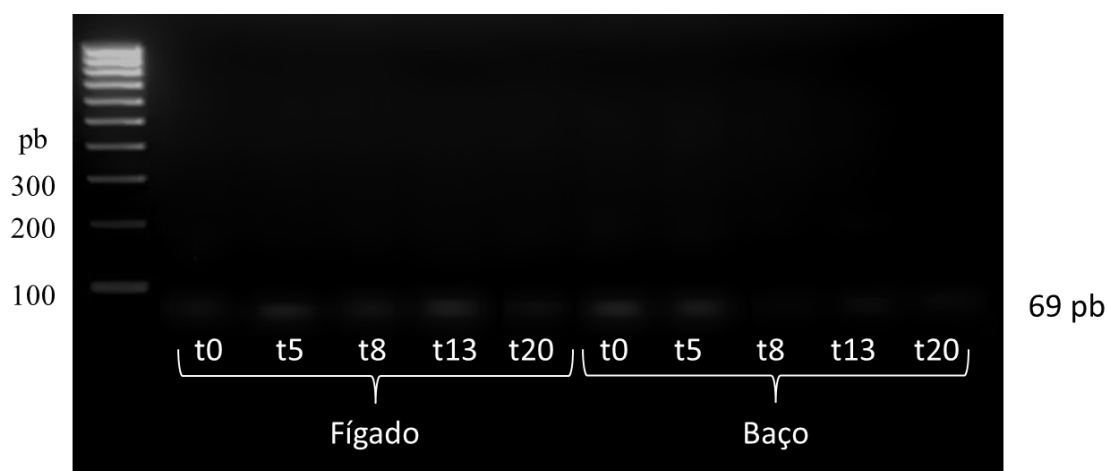


Figura 3.13 - Gel de agarose a 2,5 % com amplificação de um fragmento de 69 pb para cDNA de MMP 2 nas amostras de fígado e de baço.

Pela escassez de cDNA e para rentabilizar ao máximo o material disponível, realizaram-se PCR para as metaloproteínases tendo em conta apenas o ponto de recolha e o tipo de tecido, excluindo a organização por grupos. Como estes *primers* estão desenhados para RT-PCR os fragmentos amplificados são muito pequenos, daí o uso de géis de agarose a 2,5%. Manteve-se o uso de brometo de etídio diluído.

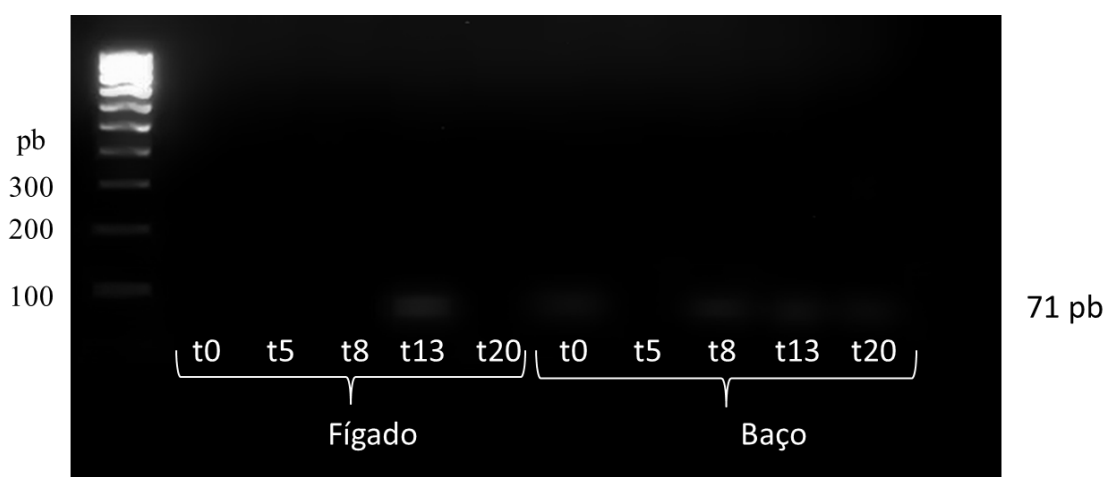


Figura 3.14 - Gel de agarose a 2,5 % com amplificação de um fragmento de 71 pb para cDNA de MMP 9 nas amostras de fígado e de baço.

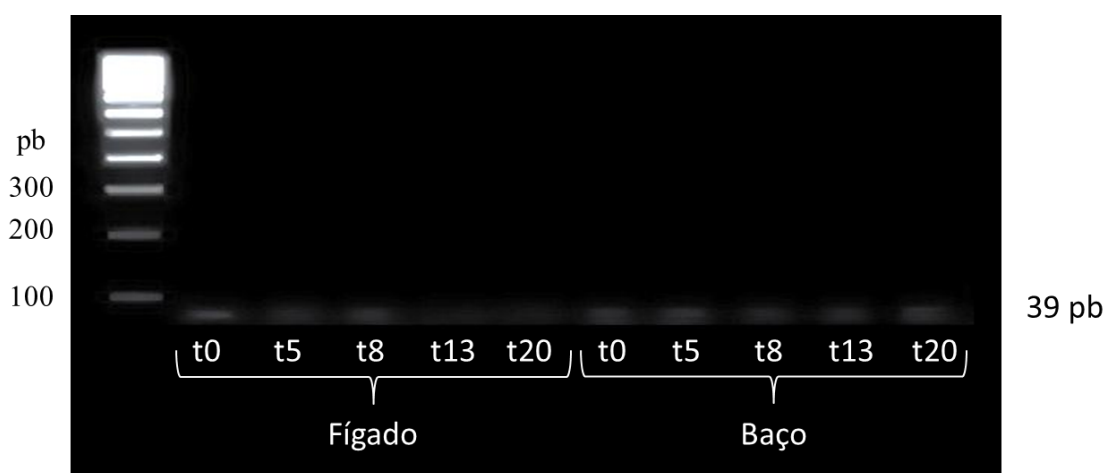


Figura 3.15 - Gel de agarose a 2,5 % com amplificação de um fragmento de 39 pb para cDNA de MMP 12 nas amostras de fígado e de baço.

4 - Discussão e Conclusões

4.1 - Fundamentação dos resultados

Apesar das doses terapêuticas se situarem acima dos 100 mg/kg/dia, e tendo sido essa a dosagem usada por Masocha *et al.* (2006) no seu trabalho com a minociclina injectável na protecção do sistema nervoso central, no presente estudo foi reduzida para metade. Suprimiram-se portanto as duas administrações por dia de 50 mg/kg nos primeiros dois dias realizando-se apenas uma. Ao invés de se iniciar a quimioterapia no dia da infecção, deu-se início dois dias antes da infecção. As razões desta diferença com o protocolo de Masocha e colaboradores, prendem-se com o facto de que durante a optimização do protocolo da actual experiência, os animais sucumbiram precocemente à infecção. A concentração da quimioterapia utilizada pode ter influenciado esse desfecho não pretendido. Por serem descritos efeitos secundários como hipertensão intracraniana, hepatite, insuficiência hepática, reacções anafiláticas, inflamação dos folhetos cardíacos mencionado algumas das mais relevantes (Infarmed, 2004), optou-se por empiricamente reduzir a dosagem inicial para 50 mg/kg/dia. Respeitam-se desta forma dois dos princípios defendidos pelo Instituto Americano de Recurso Animal de Laboratório (ILAR, 1996): (I) evitar ou minimizar o desconforto, distress ou dor e (II) fazer uso da menor quantidade possível de animais ao nível da investigação.

Os murganhos tratados emitem algo semelhante a sons guturais, após a administração do fármaco. Uma vez que o mesmo não se verifica nos controlos, essa diferença pode dever-se ao sabor da solução ou a uma reacção adversa local caracterizada por irritabilidade na mucosa do tracto digestivo dos animais, ao entrarem em contacto com a minociclina. O facto de se utilizar a mesma agulha de ponta romba nos dois grupos exclui a possibilidade da emissão dos sons por traumatismo da cavidade oral ou faringe, pois ao estar relacionada com a técnica, não existiriam diferenças entre os grupos. A diminuição na mobilidade e interacção entre os animais podem ser observados, uma primeira vez, entre os dias sete e oito pós infecção, o que pode coincidir com o primeiro pico de parasitémia. De facto, à contagem, dois dos animais controlo possuem mais de

50 parasitas/leucócito o que acontece em apenas um dos tratados. Esta diferença pode explicar porque se encontram mais letárgicos, por esta altura, os G1, pois a avaliar pelos dados recolhidos dos murganhos sacrificados a carga parasitária nos controlos pode ser superior. Depois de uma melhoria de oito dias, os animais voltam a partir do décimo sexto dia a mostrar-se progressivamente mais inertes à manipulação. Ficam de novo alheados face ao meio envolvente, evidenciando a progressão típica da infecção por *T. brucei* com a invasão de novos tecidos pelos parasitas (Kennedy, 2004). A evolução da parasitémia é aparentemente diferente em 13 DPI nos dois grupos, com todos os tratados a apresentarem mais de 40 – 50 parasitas/leucócito, valor adstrito apenas a um dos controlos, com os restantes murganhos a apresentarem, nesse tempo, valores menores que 11 parasitas por leucócito. A minociclina pode ter tido influência no estado geral dos animais pois não se notaram alterações comportamentais dignas de registo em nenhum dos dois grupos, apesar da aparente diferença nas parasitémias. Em 20 DPI assiste-se possivelmente à maior diferença média da proporção parasitas/ leucócitos entre os grupos com os controlos a possuir em média, cerca de 10x mais parasitas que os tratados. Tal explica a diferença existente no comportamento dos animais, com a inércia a recair sobre todos os animais, mas mais evidente nos controlos.

Os resultados obtidos relativamente à massa corporal dos animais são concordantes com o que se verificou no procedimento levado a cabo por Masocha *et al.* (2006) com o mesmo antibiótico *i.v.* até aos vinte dias pós infecção. Segundo os autores, a perda de peso significativa dos animais não tratados aconteceu depois desta data, altura em que no presente estudo com minociclina *p.o* os animais começaram a sucumbir naturalmente ao parasita. Dado que os murganhos utilizados por Masocha *et al* (2006) sobreviveram mais tempo sem tratamento, pode que tal se deva em parte à diferença de estirpes de *T.b. brucei* utilizadas em ambos os estudos ou ao tipo de murganhos utilizados.

Descrito na literatura, o aumento bastante evidente do perímetro abdominal dos animais deve-se pelo menos às megálias hepática e esplénica, aspecto comum na infecção laboratorial com tripanossomas africanos (Murray *et al.*, 1974). O aumento do tamanho e da massa do baço, indo até trinta vezes a sua massa inicial, está relacionado com o sequestro neste órgão de eritrócitos exibindo complexos imunes com antigénios provenientes de tripanossomas (MacKenzie e Cruickshank, 1973). Progressivamente a

fagocitose torna-se ineficaz levando à acumulação de glóbulos vermelhos nesses tecidos (Vincendeau e Bouteille, 2006), contudo o mecanismo que leva a este aumento permanece em grande parte, um mistério. No procedimento experimental do estudo, os valores das medições dos baços dos animais sacrificados vão de encontro ao descrito na literatura, aumentando com a progressão da infecção nalguns casos para mais do dobro. Excepção feita para um dos animais controlos de 20 DPI que não seguiu a tendência geral de aumento quer do seu tamanho. Uma vez que os valores hematológicos, leucocitários ou de expressão de citocinas não acompanham essa tendência desviante para esse animal, o processo de sequestro e eliminação dos complexos imunes pode ter sido mais eficaz neste *Mus musculus*. A sua parasitemia é outro parâmetro que acompanha a evolução dos restantes controlos de 20 DPI, mais um dado que suporta a hipótese de um processo fagocítico quiçá mais eficaz. Ainda que no estudo não tenha sido avaliada a evolução das características do tamanho e da massa hepáticas, parte dos eritrócitos sinalizados e dos complexos imunes são eliminados também pelas células de Kupffer no fígado (Shi *et al.*, 2004, Satoskar *et al.*, 2009), sendo de prever alterações na morfologia e fisiologia deste órgão.

A parasitemia dos animais assume um comportamento ondulante o que seria de esperar à partida. É característica desta infecção a eliminação por parte do sistema imunitário dos parasitas com VSG reconhecidas e que revestem a maioria dos tripanossomas, aumentando o número dos que apresentam uma VSG diferente e para a qual não existe no início uma resposta imunitária eficaz. Essas células não reconhecidas pelo sistema imunitário proliferam e transformam-se no novo VAT dominante, até nova eliminação e repetição do processo (Atouguia, 2005).

É possível que a minociclina tenha interferido no processo de hematopoiese, o que se pode deduzir pela observação dos gráficos relativos à concentração de eritrócitos, hematócrito e concentração de hemoglobina em ambos os grupos. A forte resposta hematopoiética descrita na fase inicial das infecções com o *Trypanosoma brucei* (Amole *et al.*, 1982), verifica-se também aqui, daí a elevação dos parâmetros hematológicos em 5 DPI. Parece neste contexto não existirem diferenças entre os grupos, excepto no último dia de sacrifício em que o valor médio para eritrócitos, hemoglobina e hematócrito dos tratados é cerca do dobro de G1. Nesse ponto, a tentativa de reposição da homeostasia hematológica parece ser mais eficaz em G2, com a concentração de eritrócitos a pa-

recer inclusivamente superior aos valores dos dois pontos anteriores aproximando-se da média inicial (0 DPI). A regeneração eritrocitária nos controlos parece pois, nestes dados, perder mais eficácia com o evoluir da infecção, quando comparado com o grupo tratado surgindo a anemia descrita na literatura (Satoskar *et al*, 2009). Conclui-se que, pela aparente diferença, pode existir mais hemoglobina em solução não agregada aos eritrócitos, nos animais tratados. Estes resultados podem ser devidos, hipoteticamente, a um défice na incorporação da hemoglobina nos novos eritrócitos, pois os valores eritrocitários são semelhantes entre os grupos. Só a quantidade média de hemoglobina por eritrócito nos tratados não acompanha a tendência dos restantes resultados do eritrograma.

A presumível diferença entre G1 e G2 para a concentração de hemoglobina é maior quando se compara a proporção da hemoglobina por eritrócito com a concentração total da proteína na amostra. Tal justificação explica porque, para semelhante número de eritrócitos nos dois grupos, os controlos parecem apresentar maior quantidade de hemoglobina por célula. Mas esta observação deixa de ser verdade para o ponto final de recolha. Os animais sujeitos ao tratamento possuem um aparente valor médio de hemoglobina por corpúsculo ligeiramente superior ao dos animais controlos, talvez com a recuperação desde 5 DPI a ser auxiliada pela minociclina. A presença de ferro na estrutura da hemoglobina tem interesse para o tripanossoma que necessita desse ião no seu metabolismo (Donelson, 2002), devido a esse aspecto, o aumento da hemoglobina associada à hemácia, em 20 DPI nos tratados, pode significar menos ferro disponível para os parasitas que nos pontos de 5 DPI a 13 DPI neste grupo.

Analizando os resultados relativos ao leucograma, os animais controlos possuem maior amplitude na variação ao longo do tempo que os tratados. Segundo Askonas e Bancroft (1984) as células *natural killer* (NK) são severamente reduzidas a partir do nono dia de infecção experimental com *T.b. brucei* o que explicará; em parte; o decréscimo acentuado que se verifica de 8 DPI para 13 DPI nas concentrações de leucócitos totais. A resposta nos animais controlos foi, a nível leucocitário; menos constante com um valor máximo em 5 DPI a evidenciar a primeira resposta à presença do agente patogénico: contudo é progressivamente suprimida. Por seu lado, a resposta nos animais tratados parece ser mais controlada, com valores menos díspares entre os diferentes pontos de recolha. Nos últimos animais sacrificados, 20 DPI, os leucócitos são em mai-

or concentração, pela primeira vez, no grupo a que foi administrado o antibiótico. Pode indagar-se se a tendência deste tipo de células dos controlos se manteria decrescente e a dos tratados a aumentar nos dias seguintes, ou ainda, se a resposta imunitária inicial foi retardada pela minociclina no segundo grupo, visto estar descrita uma proliferação das diferentes células imunitárias na resposta à infecção por tripanossomas (Vincendeau e Bouteille, 2006). Resumindo, os animais sujeitos ao tratamento obtiveram uma resposta celular ao parasita ou controlada, ou restringida nos momentos iniciais da infecção. Pode ter influência o facto de se ter iniciado o tratamento dois dias antes da infecção com *T.b.brucei*.

Elevados valores de linfócitos estão também de acordo com os trabalhos de Askonas e Bancroft (1984) por traduzirem a marcada expansão B policlonal que se dá cerca do sétimo dia pós infecção. O conjunto das células da linha linfocitária varia em igual proporção que o total de leucócitos entre os grupos de animais. Da mesma forma a resposta inicial que é marcada também pelo aumento das células T (Gasbarre *et al.*, 1980), além das B policlonais, foi à partida moldada de maneira diferente pela presença da minociclina. A percentagem de linfócitos no total de leucócitos é substancialmente mais elevada nos animais tratados em 0 DPI mas tendendo para a semelhança com os valores dos animais controlos em 13 DPI e 20 DPI. Analisando por sua vez a população linfocitária juntamente com as concentrações de granulócitos crê-se que o aumento, em 5 DPI, nos leucócitos é devido mais às células B, T e macrófagos, pois a concentração de granulócitos nesse ponto tem um valor médio idêntico entre os grupos e não acompanha a tendência dos leucócitos em geral. O pico máximo da concentração granulocitária em 8 DPI leva à possibilidade do aumento da resposta celular mediada por estas células nos animais controlos, mais que nos animais tratados.

Faz sentido introduzir a monitorização dos mediadores NO e IFN- γ neste estudo uma vez que são parte interveniente na eliminação de parasitas se bem que, por outro lado, o interferão, parece ser um factor de crescimento usado pelo tripanossoma. Os animais sujeitos ao tratamento apresentam maiores quantidades de NO em circulação principalmente em 5 DPI. Esta molécula está envolvida na resposta inflamatória, é produzida pelos macrófagos activados e assume um papel importante nas defesas do hospedeiro contra infecções. Nos animais controlos pode ter havido uma interferência maior dos tripanossomas no sistema imunitário que, induzindo a acção da arginase sob a L-

-arginina, impediram a acção da NO sintase sobre este mesmo substrato. Hipoteticamente, ao evitarem a formação do óxido nítrico pela acção da arginase, os parasitas beneficiam da L-ornitina entretanto formada. Este composto é o precursor de poliaminas e tripanotíio, factores de crescimento para o *T. brucei* (Vincendeau e Bouteille, 2006). Pode que a secreção do interferão esteja relacionada com a presença de grande quantidade de parasitas e que estes estimulem com TLTF a produção de IFN- γ a nível linfocitário. Esse aspecto beneficia o tripanossoma de forma indirecta (Vaidya *et al.*, 1997). Por outro lado, a libertação de IFN- γ associado à activação dos macrófagos pela via clássica pode ser outra explicação plausível para o possível aumento do número de leucócitos para as amostras nos animais sacrificados oito dias após a infecção.

O papel da IL-4 não se encontra esclarecido na infecção com *T. brucei* pela existência de estudos que lhe conferem inclusivamente acções antagónicas. Está descrita como crucial para o controlo do *T.b. gambiense* em ratazanas (Inoue *et al.*, 1999) ou ser irrelevante no decurso da infecção em animais privados da sua expressão (Hertz *et al.*, 1998). Relacionando a expressão desta citocina com a parasitémia parece que neste contexto a IL-4 possuiu efeito protector e por isso anti-inflamatório, uma vez que o comportamento da sua secreção é aparentemente diferente do interferão entre os dois grupos. Apesar de estar presente em menores concentrações que o IFN- γ a sua concentração máxima é atingida nos animais tratados em 8 DPI. Neste ponto a diferença entre as parasitémias parece notória entre os grupos com os tratados a apresentarem-se mais parasitados, podendo esta citocina estar relacionada em parte com a supressão do processo inflamatório causado pelos tripanossomas. Os resultados de Masocha e colaboradores (2006) sustentam que a acção protectora da minociclina pode incidir ao nível do parênquima cerebral dos animais, onde o antibiótico reduziu a secreção de várias interleucinas, TNF- α e IFN- γ . Estes dados fornecem uma explicação para que em 8 DPI os animais tratados apesar de parasitémias superiores evidenciem menores sinais de infecção. A relação entre os perfis Th1/Th2 é dada através da razão das concentrações de IFN- γ /IL-4 e favorece largamente o perfil pró-inflamatório, pela aparente diferença na secreção de cada uma das citocinas em ambos os grupos. Nos valores obtidos existe uma relação directa entre a progressão da infecção e a desproporção entre a síntese de ambas as moléculas. Considerando apenas o primeiro e o último ponto, em 0 DPI a IL-4 é secretada aparentemente três vezes menos que o IFN- γ nos dois grupos. No tempo 20 DPI

essa presumível diferença aumenta para cerca de 80x nos tratados e 166x nos controles. Este aspecto corrobora a descrição na literatura (revisto por Baral, 2009) em que a não supressão do processo inflamatório leva à morte do hospedeiro: em 27 DPI, todos os animais restantes de G1 e de G2 tinham sucumbido à infecção. Pode então deduzir-se que, pela marcada intervenção de um perfil Th1 não se assistiu à alteração do tipo de resposta inflamatória para, em vez de acção sobre o parasita, tentar o controlo da própria inflamação. Parece pois que os animais possuem neste estudo uma resposta imune característica do período hemolinfático da doença, sendo inevitável o óbito dos murganhos, mesmo com a possibilidade da ausência de parasitas no SNC.

Com os dados referentes ao NO associados ao que se expôs sobre IL-4 e IFN- γ , é possível afirmar que a minociclina pode ter efeito protector momentâneo nos animais tratados pois o sistema imunitário parece ter evoluído no sentido de favorecimento dos parasitas, o que pode ser reflexo dos resultados encontrados para as parasitémias em 20 DPI. A diminuição de IFN- γ e a maior produção de NO são aspectos que em conjunto diminuem a replicação parasitária e aumentam a eficácia das defesas do hospedeiro no grupo tratado. No presente estudo, não foi contudo um aspecto em grau suficiente para levar os tratados, no seu conjunto, a sobreviverem mais dias que os controles após 20 DPI.

A optimização dos protocolos de PCR para as IL-2, -4 e -6 permitirá estudar num passo seguinte por RT-PCR, a expressão diferencial desses genes a partir do mRNA para cada um dos mediadores. Pretender-se-á cruzar os dados da sua expressão nos tecidos de fígado e baço, com os que se obtiveram com o soro dos animais. No caso de a minociclina possuir efeito de protecção contra a infecção, será de esperar uma menor expressão de IL-2 nos animais controlos em comparação com os tratados. Tal iria de encontro ao descrito na literatura, uma vez que a incompetência progressiva do sistema imune parece dever-se à inibição da proliferação das células T também pela baixa na produção de IL-2 (Sileghem *et al.*, 1989). Relativamente ao comportamento da IL-4 para a qual será necessária ainda a optimização do protocolo, a monitorização serviria o propósito de avaliar a influência da quimioterapia na capacidade de resposta do hospedeiro à inflamação causada pelo contacto com factores tripanossomais na montagem da resposta imune. Dado que a IL-4 possui segundo Namangala *et al.*, (2009) acção tipo II, ou seja anti-inflamatória, pretender-se-ia averiguar se a minociclina influencia a produ-

ção desta citocina nos animais tratados e estabelecer um paralelismo com os resultados encontrados com a técnica de ELISA para as citocinas presentes nos soros. Esta foi a única citocina para a qual não se conseguiu amplificação mesmo com o ajuste das diferentes temperaturas do ciclo e mudança de termociclador, o que leva a crer que pode existir algum problema com os próprios *primers* comerciais, visto ter-se conseguido amplificação, comprovada nas figuras exibidas nos Resultados com os restantes *primers*. A IL-6 possui perfil pró-inflamatório estando associada à resposta inicial do hospedeiro à presença do parasita (Namangala *et al.* 2009). Teria interesse estudar o seu comportamento ao longo da infecção no contexto do tratamento, em que caso influenciasse a síntese desta citocina, assistir-se-ia a concentrações superiores nos animais controles logo nos primeiros dias após a infecção.

Para as restantes citocinas, os resultados de PCR de IFN- γ permitiriam a comparação com os ELISA previamente realizados, bem como os resultados a obter com a PCR para o factor de necrose tumoral. O TNF- α pode ser libertado em quantidades consideráveis podendo causar perda de peso evoluindo para caquexia no decurso da infecção com tripanossomas. Inversamente, contribui num primeiro momento para o controlo da parasitemia (Maggez *et al.* 1999). O seu estudo neste contexto da quimioterapia com minociclina é importante também porque o envolvimento de TNF- α na inibição das células T no baço, peritoneu e nódulos linfáticos parece estar ainda relacionado com o aumento da produção de prostaglandinas e NO (Scheilfer e Mansfield, 1993). Poder-se-ia pois comparar os níveis de libertação do factor de necrose a nível dos tecidos do baço e fígado com os níveis de secreção de NO de que se dispõem resultados. Este factor estimula ainda o desenvolvimento de células supressoras pela indução da produção de IFN- γ ao nível do nódulo linfático do rato infectado com *T. brucei* (Darji *et al.*, 1996), justificando a acção do TNF- α a pertinência para a sua inclusão no presente estudo.

O aumento da titulação de IgM anti-*T.b.brucei* em ambos os grupos é outra característica importante das defesas do hospedeiro, surgindo como a resposta humoral primária: são as IgM que sinalizam os primeiros antígenos posteriormente eliminados pelos fagócitos (Paul, 2003). Viu-se que em 5 DPI existiu provavelmente, além de outros leucócitos, uma marcada expansão de células B policlonais. Tal faz sentido uma vez que três dias depois, em 8 DPI, os animais de ambos os grupos aparentam apresentar titulações de IgM superiores aos pontos anteriores. Ou seja, houve tempo e condi-

ções para a maturação dos anticorpos e com eles da primeira resposta humoral mais significativa, mas ainda não o suficiente para a eliminação dos parasitas, pelas elevadas parasitémias encontradas. A resposta pelas IgM parece ser mais sustentada nos animais tratados pois assiste-se ao seu aumento nas amostras do último dia de colecta, o que não acontece nos animais de G1. Este aumento vem sustentar a hipótese de que a minociclina pode exercer efeito sinérgico no estabelecimento da resposta humoral: é também em 20 DPI que a contagem média de linfócitos nos tratados supera os controlos, possivelmente linfócitos B secretores de IgM, observação esta a necessitar ainda de suporte experimental futuro. Analisando criticamente o comportamento dos títulos da produção de IgG anti-*T.b. brucei* as variações são maiores entre os grupos nos pontos de 8 DPI a 20 DPI, com ganho franco para os tratados no último ponto. A observação destes resultados está na linha do que foi discutido até ao momento: é mais um elemento a fortalecer a possível actividade da minociclina, até 20 DPI, enquanto agente que evita a exaustão das defesas do hospedeiro. À medida que se progride no tempo a presumível diferença acentua-se a favor dos animais tratados com valores superiores de titulações para as imunoglobulinas IgG2a e IgG3. No último ponto existe uma marcada redução das duas subclasses referidas face a 13 DPI nos controlos. Entre esses dois pontos, nos tratados há um aumento ligeiro de IgG3 e evidente de IgG2a, novos indícios de actividade dos linfócitos que têm a sua percentagem aumentada em 20 DPI em contraponto com o anterior.

As alterações decorrentes da infecção com *T. brucei* no fígado e no baço no modelo animal estão bem descritas na literatura. O sequestro de eritrócitos cobertos com antígenos provenientes da eliminação dos parasitas avoluma-se ao longo do tempo no fígado e no baço, pela incapacidade progressiva dos macrófagos em eliminar eficazmente todos os complexos imunes. Essa acumulação pode levar à congestão na periferia dos seios esplénicos causando necrose focal com macrófagos endoteliais e hemácias ingeridas (Cook e Zumla, 2003). Pelo desarranjo tecidual que tal congestão provoca, interessa avaliar a acção sobre a gelatina de soluções contendo amostras de tecido de fígado e de baço, uma vez que as MMP possuem actividade em estados patológicos (Masocha *et al*, 2006, Burggraf *et al*, 2006) e sendo responsáveis pelo aumento da inflamação dos tecidos (Acharya, 2004). Identificam-se em ambas as tabelas de zimografia, de fígado e baço, bandas a aproximadamente 80 kDa de altura, mais evidentes no tecido esplénico.

São provavelmente metaloproteinases endógenas do tecido animal, uma vez que nos dados apresentados existe a supressão dessas enzimas com a progressão da doença: não volta a identificar-se bandas a esta altura em nenhum dos momentos posteriores, para nenhum dos grupos.

Em geral as MMP são libertadas das células sob uma forma proteolítica inactivada designada zimogénio, com massa molecular 10 kDa maior que a MMP activa. Uma vez que o zimogénio é activado durante a renaturação do gel pela eliminação do SDS, ambas as formas podem ser detectadas no zimografia (Hawkes *et al*, 2001) e parece ser este o caso. Tanto no caso dos fígados como dos baços, existe um sistema de dupla banda com aproximadamente 10 kDa de diferença que se posiciona entre 30 e 40 kDa. Nos fígados, a banda relacionada com a metaloproteinase mais leve só surge em ambos os grupos a partir de 8 DPI e são observadas com maior ou menor intensidade, em todas ou em parte das amostras, até 20 DPI. Já nos baços, a dupla banda está presente logo deste 0 DPI, com maior intensidade em todas as amostras, mais que nos tecidos com proveniência hepática. A degradação da gelatina a cerca de 40 kDa poderá ter mais que uma metaloproteinase na sua origem. Podem em parte ser provenientes do tripanossoma, o que vai de encontro ao estudo de De Sousa *et al* (2010) que identificou metaloproteinases em zimografias também à altura de 40 kDa em extracto de tripanossoma. Por outro lado, devido aos resultados obtidos em 0 DPI, em que não existem tripanossomas em circulação, a degradação da gelatina mais acentuada a partir de 5 DPI quer no fígado quer no baço, pode dever-se a uma desregulação das metaloproteinases endógenas do hospedeiro. O paralelismo com o estudo de De Sousa *et al* (2010) permite a afirmação de que serão metaloproteinases as enzimas obtidas nos zimografias. Além da dupla banda presente quando a degradação se deve a MMP, no estudo de Masocha *et al*. (2006), a expressão destas endopeptidases encontra-se aumentada no cérebro e no baço de animais, no contexto de infecção experimental com *T.b. brucei*.

No que diz respeito às bandas mais visíveis nos zimografias e aquelas que revelam maior degradação da gelatina, parece observarem-se diferenças ténues entre os controlos e tratados. No tecido hepático não se observam aparentes diferenças em 0 DPI e em 5 DPI existe, num dos tratados, maior actividade a \pm 40 kDa que nos restantes animais desse ponto. Em 8 DPI, os animais a quem foi administrada minociclina apresentam todos eles aparentemente maior degradação da gelatina que os controlos no sistema

de dupla banda a ± 30 e ± 40 kDa. Em 13 DPI pode que exista, pela análise dos dados, maior actividade enzimática nos controlos quando comparada com o grupo tratado. Por último, em 20 DPI o sistema de dupla banda à mesma altura já referida surge em dois murganhos sujeitos ao tratamento e apenas num dos controlos, possivelmente como indício de maior degradação por parte das formas activas de MMP.

Aludindo às amostras de baço surgem diferenças também ténues entre as bandas. Sem aparentes diferenças visíveis entre os grupos no primeiro ponto. Em 5 DPI aquelas a ± 30 kDa são mais intensas nos controlos, o que revela maior degradação pelas formas activas de MMP. Tal não parece acontecer nos tratados que possuem maior degradação à altura da suposta proMMP. Em 8 DPI os sistemas de dupla banda são mais intensos nos tratados e em 20 DPI existe possivelmente mais degradação do substrato a uma altura de ± 40 kDa o que não acontece nos tratados que possuem bandas mais intensas, quando comparados com os controlos a ± 30 kDa. Resumindo, as variações no perfil enzimático nas amostras de tecido do fígado e do baço dos animais sacrificados ao longo da experiência apresentam variações de intensidade mais do que variações nos tamanhos das metaloproteinases. As restantes bandas identificadas dispersamente ao longo dos tempos em ambos os tipos de amostras e nos dois tecidos podem corresponder a metaloproteinases endógenas do hospedeiro, pois não foram identificadas no trabalho de De Sousa *et al* (2010). A sua presença não parece ter influência no decurso normal da infecção em ambos os grupos de murganhos.

Espera-se concluir a análise do papel das metaloproteinases, assim como o perfil da expressão diferencial de cada uma das MMP (-2, -9 e -12) a partir dos estudos de PCR quantitativo. Neste estudo foram ainda otimizados os ensaios de PCR para amplificação dos genes de IL-2, IL-6, IFN- γ e TNF- α que posteriormente serão analisados por PCR em tempo real, além da optimização da PCR para IL-4, sem resultados até ao momento de redacção da tese.

4.2 - Conclusões

Olhando para os objectivos específicos iniciais traçados, consideram-se todos atingidos, excepto os objectivos relativos à quantificação de diferentes interleucinas e

metaloproteinases (objectivos 9 e 10 respectivamente) de que se exhibe a optimização dos protocolos para PCR. No que diz respeito ao que foi descrito e discutido em termos de resultados conclui-se que:

- 1) Observou-se esplenomegália em ambos os grupos pelo que o medicamento não teve actividade aparente na sua redução. É no entanto possível que tenha existido interferência no processo de hematopoiese, principalmente no último dia de sacrifício em que o valor médio para eritrócitos, hemoglobina e hematócrito dos tratados é cerca do dobro dos controlos. Nesse ponto, a tentativa de reposição da homeostasia hematológica parece ser mais eficaz sob efeito do tratamento;
- 2) Na evolução dos leucócitos, os animais sujeitos ao tratamento parecem ter obtido uma resposta celular ao parasita ou controlada, ou pelo contrário suprimida nos momentos iniciais da infecção. A multiplicação dos leucócitos assume nos últimos dois tempos concentrações crescentes nos tratados ao invés dos controlos. Aparentemente, os linfócitos acompanham a evolução leucocitária e os granulócitos não se alteram no decorrer da infecção, assumindo presumivelmente um papel secundário;
- 3) Na expressão de IFN- γ , citocina inflamatória, parece ser mais relevante no grupo controlo e a minociclina de alguma forma pode surgir como facilitadora de uma defesa do tipo II, anti-inflamatória com a IL-4 expressa em 8 DPI, em termos médios, em maior quantidade nos tratados. Os animais sujeitos ao tratamento aparentemente secretam maiores quantidades de NO principalmente cinco dias após a infecção, factor associado a uma melhor resistência contra o parasita;
- 4) A produção dos títulos de IgM parece ser mais sustentada nos animais tratados pois assiste-se ao seu aumento nas amostras do último dia de colecta, o que não acontece nos controlos que continuam a decrescer até ao final da experi-

ência. Este aparente aumento sustenta a hipótese da minociclina exercer efeito sinérgico no estabelecimento da resposta humoral nos murganhos tratados;

- 5) A produção das titulações de IgG2a e IgG3 específicas para *T.b. brucei* parece ser mais eficaz nos animais tratados, com aparentes valores superiores a pertencer a este grupo em comparação com os controlos.
- 6) Na acção das metaloproteinases parecem existir diferenças ténues entre os controlos e tratados, com o predomínio da actividade sobre o substrato em duas bandas, uma com cerca de 30 kDa e outra com aproximadamente 40 kDa. Há aparente actividade enzimática mais extensa no tecido esplénico que no hepático. Não se observam diferenças substanciais na largura de banda e/ou posicionamento das mesmas ao longo dos cinco pontos de recolha. A presença de outras metaloproteinases seja altas (125 a 190 kDa) ou baixas (10 a 20 kDa), não possuem aparente influência no decurso da infecção, quando comparados com a parasitémia ou valores hemato-serológicos. A presença das metaloproteinases parece ser mais expressiva em nos pontos 5 DPI e 13 DPI.

É possível afirmar de todo o processo que o modelo experimental seguido é eficaz na avaliação de fármacos anti-tripanosossoma. Pode considerar-se um modelo fiável e completo pela diversidade de parâmetros a que se recorre para avaliar a imunopatologia e fisiologia da interacção do tripanossoma com o modelo animal: hemogramas, quantificação de citocinas ou a actividade e expressão de metaloproteinases. No que se relaciona mais concretamente com esse último aspecto, as MMP, o modelo de determinação da actividade quer *in vivo* (em *Mus musculus*) quer *in vitro* (por zimografia) fornece uma noção perceptível da actividade destas proteinases ao longo da progressão da infecção. Neste estudo, em termos técnicos, são estas as principais mais valias encontradas.

4.3 - Limitações

Porque a investigação faz-se a cada passo, deve reflectir-se sobre as limitações entretanto identificadas no decurso do estudo. Este ponto funciona como um olhar crítico do investigador face ao seu trabalho desenvolvido, na tentativa de obter no futuro resultados com qualidade crescente.

A principal limitação que se revelou de suma importância foi a constituição dos grupos de animais. Para conseguir a inferência estatística, em estudos posteriores há que obter dados em cada ponto de colheita de pelo menos seis animais de cada grupo. Apenas três sacrifícios não permitem muito mais que a análise dos casos um a um. Pode que se estejam a forçar resultados que não retratem, na integra, a realidade experimental. Outro aspecto a rever no futuro é a contagem de parasitas. O processo de contagem através das lâminas é moroso e induz em erro, além de que exibir as parasitémias dos animais sacrificados mostrou-se manifestamente insuficiente. No futuro, para se ter uma ideia mais consistente da variação do número de parasitas por ml de sangue poderá recorrer-se ao método rápido utilizado pela primeira vez por Lumsden e Herbert em 1976 que pode ser efectuado *in loco* utilizando gota espessa de sangue de mais animais, logo com resultados estatisticamente mais válidos.

A introdução da nova técnica de administração *per os* com o auxílio da agulha de ponta romba e o facto do tratamento diário dever ser feito sempre pelo investigador levantou alguns problemas relativamente aos horários de administração. Períodos laborais por turnos não permitiram a administração diária à mesma hora, o que pode ter tido influência nas concentrações plasmáticas da minociclina apesar desta de manter em circulação por longos períodos. A forma de contornar a situação passará por mais investigadores aprenderem a utilizar a agulha para administrações orais e pelo uso, se possível, de substâncias com semi-vida superior a 24 horas tornando desnecessária a manipulação diária dos animais. A escolha desse tipo de drogas seria também uma forma de minimizar o sofrimento e desconforto dos murganhos, além de fornecer informação sobre a influência destes novos fármacos nesta patologia.

4.4 - Perspectivas futuras

Foi com este estudo desenvolvido um modelo animal que poderá ser utilizado como ferramenta para avaliação farmacológica de inibidores de metaloproteinases ou da sua influência na fisiopatologia da infecção com *T.b. brucei*. Por seu lado, embora se trate de uma doença negligenciada sem que seja economicamente viável a investigação de novos fármacos anti-tripanosossoma, a indústria farmacêutica desenvolve todo um manancial de novas moléculas destinadas a outras patologias que podem ser alvo de estudos como este. Com a supressão do grupo que lhes confere actividade antibacteriana, as tetraciclinas modificadas (CMT) são utilizadas pelos seus efeitos secundários, como é a inibição das metaloproteinases. A CMT-3, ainda em ensaios, pré-clínicos ou a tigeciclina, lançada no mercado em 2005, constituem possibilidades a utilizar no contexto da infecção com tripanossoma, em esquema monoterapêutico ou em associação.

Como está patente e foi realçado ao longo do texto, após a optimização do protocolo para a IL-4 serão realizados PCR quantitativos para IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ para todas as amostras de fígado e baço tentando-se a quantificação das mesmas através do programa *Gelquant*[®]. Com os *primers* para MMP-2, MMP-9 e MMP-12 pretende-se a amplificação por RT-PCR, uma vez que os *primers* foram desenhados para essa técnica. Estes novos dados servirão para análise conjunta com a informação anteriormente obtida, na tentativa de melhor discutir as conclusões que constituem os resultados da tese apresentada.

Referências bibliográficas

- Acharya, M. R., Venitz, J., Figg, W. D., & Sparreboom, A. (2004). Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases. *Drug Resistance Updates* 7, 195-208.
- Atouguia, J. (2005). *Tripanossomose Humana Africana*. Lisboa: Universidade Aberta.
- Bangs, J. D., Ransom, D. A., Nimick, M., & G. C. (2001). In vitro cytocidal effects on *Trypanosoma brucei* and inhibition of *Leishmania major* GP63 by peptidomimetic metalloprotease inhibitors. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 111–117.
- Baral, T. N. (2009). Immunobiology of African Trypanosomes: Need of Alternative Interventions. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 24.
- Barrett, Michael P.; et al. (2003). The Trypanosomiasis. *The Lancet*, 362, 1469-80.
- Bennett, P. N., & Brown, M. J. (2003). *Clinical Pharmacology*. Philadelphia: Churchill Livingstone.
- Berriman, Matthew; et al. (2005). The Genome of African Trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, 309, 416-422.
- Birkendal-Hansen, H., Moore, W., Bodden, M., Windsor, L., Birkendal-Hansen, B., DeCarlo, A., et al. (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 197-250.
- Bode, W., Fernandez-Catalan, C., Tschesche, H., Grams, F., Nagase, H., & Maskos, K. (1998). Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 639-652.
- Bradford, M. M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.

- Brunton, L. L., Parker, K. L., Blumenthal, D. K., & Buxton, I. L. (2008). *Goodman & Gilman's Manual of Pharmacology and therapeutics*. San Diego: McGraw-Hill.
- Bulow, R., Nonengasser, C., & Overath, P. (1989). Release of the variant surface glycoprotein during differentiation of bloodstream to procyclic forms of *Trypanosoma Brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 85-92.
- Burggraf, D., Trinkl, A., Dichgans, M., & Hamann, G. F. (2006). Doxycyclin inhibits MMPs via modulation of plasminogen activators in focal cerebral ischemia. *Neurobiol. disease*, 506-513.
- Cawtson, T. (1995). Proteinases and inhibitors. *Br. Med. Bull*, 385-401.
- Chappuis, F., Loutan, L., Simarro, P., Lejon, V., & Büscher, P. (2005). Options for Field Diagnosis of Human African Trypanosomiasis. *Clinical Microbiology reviews*, 133-146.
- Chin, J. (2000). *Control of Communicable Diseases manual* (17 ed.). Washington: American Public Health Association.
- Cook, G. C., & Zumla, A. I. (2003). *Manson's Tropical Diseases* (23 ed.). Edinburgh: Elsevier Science Limited & W. B. Saunders.
- Cross, G. (1975). Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of *Trypanomosa brucei*. *Parasitology*, 71, 393-417.
- Darji, A., Beschin, A., Sileghem, M., Heremans, H., Brys, L., & De Baetselier, P. (1996). In vitro simulation of immunosuppression caused by *Trypanosoma brucei*: active involvement of gamma interferon and tumor necrosis factor in the pathway of suppression. *Infection and Immunity*, 64, 1937-1943.
- Ding, L.; Linsley, P.S.; Huang, L.Y.; et al. (1993). IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *Journal of Immunology*, 151, 1224-1234.
- Donelson, J. E. (2002). Antigenic Variation and the African trypanosome genome. *Acta Tropica*, 391-404.

- Donelson, J. E., Hill, K. L., & El-Sayed, N. M. (1998). Multiple mechanisms of immune evasion by African trypanosomes. *Mol. and Bio. Parasitol.*, 51-66.
- E.M. Fèvre, K. P. (2006). Human African Trypanosomiasis: Epidemiology and Control. In D. Molyneux, *Advances in Parasitology - Control of Human Parasitic Diseases* (Vol. 61, pp. 168-202). Elsevier.
- Fairlamb, A. (1990). Future prospects for the chemotherapy of human trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 613-617.
- Fairlamb, A. H., Weislogel, P., H., H. J., & Borst, P. (1978). Isolation and characterisation of kinetoplast DNA from bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Biol.*, 76, 293-309.
- Fargeas, C., Wu, C., Nakajima, T., Cox, D., Nutman, T., & Delespesse, G. (1992). Differential effects of transforming growth factor β on the synthesis of Th1 and Th2-like lymphokines by human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 2173-2176.
- Faust, E., Beaver, P., & Jung, R. (1987). *Agentes e Vetores Animais de Doenças Humanas*. Porto: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Field, M. C., & Carrington, M. (2009). The trypanosome flagellar pocket. *Nature Reviews Microbiology*, 775-786.
- Ford, L. B. (2007). Civil conflict and sleeping sickness in Africa in general and Uganda in particular. *Conflict and Health*, 1-25.
- Gobert, A., Daulodère, S., Lepoivre, M., Boucher, J., Cespuglio, R., Buquet, A., et al. (2000). L-arginase availability modulates local NO production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. *Infect Immun.*, 4653-4657.
- Golub, L., Lee, H., Ryan, M., Giannobile, W., Paine, J., & Sorsa, T. (1998). Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv. Dent. Res.*, 12-26.
- Grandgenett, P. M., Otsu, K., Wilson, H. R., Wilson, M. E., & Donelson, J. E. (2007). A Function for a Specific Zinc Metalloprotease of African Trypanosomes. *Plos Pathogens*, 3, 1432-1445.

- Griess, P. (1879). Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedik“Ueber einige azoverbindungen.”. *Chem. Ber.*, 12, 426–428.
- Gruszyński, A. E., Deursen, F. J., Albareda, M. C., Best, A., Chaudhary, K., Cliffe, L. J., et al. (2006). Regulation of surface coat exchange by differentiating African trypanosomes. *Mol. & Biochem. Parasitol.*, 211–223.
- Hamadien, M., Nycke, N., & Bakhiet, M. (1999). Inducing of trypanosome lymphocyte triggering factor (TLTF) and neutralising antibodies to the TLTF in experimental African trypanosomiasis. *Immun.*, 606–611.
- Hawkes, S. P., Li, H., & Tanicuchi, G. T. (2001). Zymography and Reverse Zymography. (I. M. Clark, Ed.) *Methods in Molecular Biology*, 151, 399–410.
- Hertz, C. J., Filutowicz, H., & Mansfield, J. M. (1998). Resistance to the African Trypanosomes Is IFN-gamma Dependent. *The Journal of Immunology*, 6775–6783.
- Hide, G., Gray, A., Harrison, C., & Tait, A. (1989). Identification of an epidermal growth factor receptor homologue in trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 51–59.
- Hoare, C. (1972). *The Trypanosomes of Mammals (A Zoological Monograph)*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Inoue, Noboru; Inoue, Misuzu; Kuriki, Ken; et al. (1999). Interleukin 4 is a crucial cytokine in controlling *Trypanosoma brucei gambiense* infection in mice. *Veterinary Parasitology*, 80, 173–184.
- International Laboratory for Research on Animal Diseases (ILRAD). (1979). *Research and Training Activities*. Nairobi.
- Irjanheikki, J., T. Tikka, R. K., Goldsteins, G., Chan, P., & Koistinaho, J. (1999). A tetracycline derivate, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 13496–13500.

- Joshi, Prashant P.; Shegokar, VisJay R.; Powar, Rajaram M.; et al. . (2005). Human Trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 491-495.
- Kasper, Dennis L.; Braunwald, Eugene; Fauci, Anthony S.; et al. (2005). *Harrison - Manual de Medicina* (6 ed.). Madrid: McGraw Hill - Interamericana de España.
- Kennedy, P. G. (2004). Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. *The Journal of Clinical Investigation*, 496-504.
- LaCount, D. J., Gruszynski, A. E., P. M., Bangs, J. D., & Donelson, J. E. (2003). Expression and Function of the *Trypanosoma brucei* Protease (GP63) Genes. *Journal of Biological Chemistry*, 4658–24664.
- Lança, A. S., Sousa, K. P., Atougua, J., Prazeres, D. M., Monteiro, G. A., & Silva, M. S. (2011). *Trypanosoma brucei*: Immunisation with plasmid DNA encoding invariant surface glycoprotein gene is able to induce partial protection in experimental African trypanosomiasis. *Exp. Parasitol*, 18-24.
- Legros D, O. G.-E. (2002). Treatment of human African trypanosomiasis - present situation and needs for research and development. *Lancet Infectious Diseases*, 437-440.
- Lejon, Legros, Richer et al. (2002). IgM quantification in the cerebrospinal fluid of sleeping sickness patients by a latex card agglutination test. *Trop Med Int Health*, 8, 685-692.
- Leonardo, M., Esser, K., Moon, A., Van der Ploeg, L., & Donelson, J. (1986). Metacyclic variant surface glycoprotein genes of *Trypanosoma brucei* subsp. rhodesiense are activated in situ, and their expression is transcriptionally regulated. *Mol Cel Biol*, 1991-1997.
- Magez, S., Stijlemans, B., Baral, T., & De Baetselier, P. (2002b). VSG-GPI anchors of African trypanosomes: their role in macrophage activation and induction of infection-associated immunopathology. *Microbes and Infection*, 4, 999-1006.
- Magez, Stefan; Radwanska, Magdalena; Beschin, Alain; et al. (1999). Tumor Necrosis Factor Alpha Is a Key Mediator in the Regulation of Experimental *Trypanosoma brucei* Infections. *Infection and Immunity*, 3128–3132.

- Masocha, W., Rottenberg, M. E., & Kristensson, K. (2006). Minocycline Impedes African Trypanosome Invasion in the brain of the murine model. *Amer. Soc. for Microbiol.*, 1798–1804.
- Masocha, W., Rottenberg, M. E., & Kristensson, K. (2007). Migration of African trypanosomes across the blood–brain barrier. *Physiol. & Behavior*, 110–114.
- Matovua, E., Seebeck, T., Enyarua, J. C., & Kaminsky, R. (2001). Drug resistance in *Trypanosoma brucei* spp., the causative agents of sleeping sickness in man and nagana in cattle . *Microbes and Infection*, 763-770 .
- Matthews, K. (1999). Developments in differentiation of *T. brucei*. *Parasitol. Today*, 15, 76-80.
- Matthews, K. R., Ellis, J. R., & Paterou, A. (2004). Molecular regulation of the life cycle of African Trypanosomes. *Trends in Parasitology*, 20, 40-47.
- McKane, L., & Kendel, J. (1996). *Microbiology:essentials and applications* (2 ed.). New York: McGraw-Hill, Inc.
- Milord, F. e. (1993). Eflornithine concentrations in serum and cerebrospinal fluid of 63 patients treated for *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 473–477.
- Mowatt, M., & Clayton, C. (1987). Developmental regulation of a novel repetitive protein of *Trypanosoma Brucei*. *Mol. Cell. Biol.*, 2833–2844.
- Murray, M., Morrison, W., Murray, P., Clifford, D., & Tail, J. (1979). Trypanotolerance - a review. *Wildlife Animal Review*, 11 p.
- Namangala, B., de Baetselier, P., & Beschin, A. (2009). Both Type-I and Type-II Responses Contribute to Murine Trypanotolerance. *J. Vet. Med. Sci.*, 313–318.
- Njiru, Z., Ndung'u, K., Mamete, G., & al, e. (2004). Detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense* in animals from sleeping sickness foci in East Africa using the serum associated (SRA) gene. *Acta Tropica*, 90, 249-254.
- OMS. (2001). *TDR Report on African Trypanosomiasis (Sleeping Sickness)*.
- Parks, W. C. (1999). Matrix metalloproteinases in repair. *Wound REP. REG.*, 423-432.

- Pereira-Maia, E. C., Silva, P. P., Almeida, W. B., Santos, H. F., Marcial, B. L., Ruggiero, R., et al. (2010). Tetraciclinas e glicilciclinas: uma visão geral. *Quim. Nova*, 700-706.
- Perry, B., Randolph, P., McDermott, J., Sones, K., & Thornton, P. (2002). *Investing in Animal Health research to Alleviate Poverty*. Nairobi: ILRI (International Livestock Research Institute).
- Powar, R., Shegokar, V., Joshi, P., Dani, V., Tankhiwale, N., Truc, P., et al. (2006). A rare case of human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi*. *Indian J. Med. Microbiol.*, 24, 72-4.
- Rasooly, R., & Balaban, W. (2004). Trypanosome microtubule-associated protein p15 as a vaccine for the prevention of African sleeping sickness. *Vaccine*, 22, 1007-1015.
- Roditi, I., Furger, A., Ruepp, S., Schurch, N., & Butikofer, P. (1998). Unraveling the procyclin coat of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 91, 117-130.
- Rushton, J. (2009). *The economics of Animal Health & Production*. Londres: MPG Books, Ltd.
- Satoskar, A. R., Simon, G. L., Hotez, P. J., & Tsuji, M. (2009). *Medical Parasitology*. Austin, USA: Landes Bioscience.
- Schleifer, K. W., & Mansfield, J. (1993). Supressor macrophages in African trypanosomiasis inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and prostaglandins. *Journal of Immunology*, 151, 5492-5503.
- Service, M. (2001). *The Encyclopedia of Arthropod Transmitted Infections*. London: Biddles Ltd.
- Shi, M., Wei, G., Pan, W., & Tabel, H. (2004). *Trypanosoma congolense* infections: antibody mediated phagocytosis by Kupffer cells. *Journal of leukocyte biology*, 76, 399-405.
- Sileghem, M., Darji, A., Hamers, R., Van de Winkel, M., & De Baetselier, P. (1989). Dual role of macrophages in the suppression of interleukin 2 production and

- interleukin 2 receptor expression in trypanosome-infected mice. *European Journal of Immunology*, 19, 829-835.
- Silva, M., Prazeres, D., Lança, A., Atouguia, J., & Monteiro, G. (2009). Trans-sialidase from *Trypanosoma brucei* as a potential target for DNA vaccine development against African trypanosomiasis. *Parasitol. Res.* , pp. 1223–1229.
- Simarro, P., Jannin, J., & Cattand, P. (2008). Eliminating human African trypanosomiasis: Where do we stand and what comes next? *Plos Medicine*, 174-180.
- Sousa, K. P., Atouguia, J., & Silva, M. S. (2010). Partial Biochemical Characterization of a Metalloproteinase from the Bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* brucei parasites. *Protein J.*, 29, 283-289.
- Sternberg, J., & Mabbott, N. A. (1996). Nitric oxide-mediated suppression of T cell responses during *Trypanosoma brucei* infection: soluble trypanosome products and interferon gamma are synergistic inducers of nitric oxide synthase. *European Journal of Immunology*, 26, 539-543.
- Sternberg, J., & Tait, A. (1990). Genetic exchange in African trypanosomes. *Trends in Genetics*, 6, 317-322.
- Subramanya, S., Armah, D., & Mensa-Wilmat, K. (2010). *Trypanosoma brucei*: reduction of GPI-phospholipase C protein during differentiation is dependent on replication of newly transformed cells. *Exp Parasitol.*, 222-229.
- Taylor, K. A. (1998). Immune responses of cattle to African trypanosomes: protective or pathogenic? *International Journal for Parasitology*, 28, 219-240.
- Teles, R. M., Teles, R. B., Amadeu, T. P., Moura, D. F., Mendonça-Lima, L., Ferreira, H., et al. (2009). High Matrix Metalloproteinase Production Correlates with Immune Activation and Leukocyte Migration in Leprosy Reactional Lesions. *Amerir. Soc. for Microbiol.*, 1012–1021.
- United States Animal Health Association (USAHA). (2008). *Foreign Animal Diseases*. St. Joseph: Boca Publications, Inc.

- Vickerman, K. (1997). Landmarks in Trypanosome reseach. *Trypanosomiasis and Leishmaniasis, Cab international*, 1-37.
- Vincendau, P., & Bouteille, B. (2005). Immunology and immunopathology of African Trypanosomiasis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 645-665.
- Vincendeau, P., Gobert, A., Dauloède, S., Moynet, D., & Mossalayi, M. (2003). Arginases in parasitic diseases. *Trends Parasitol.*, 9-12.
- Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases:structure, function and biochemistrtry. *Circ. Res.*, 827-839.
- Webb, Helena; Carnall, Nicola; Vanhamme, Luc; et al. (1997). The GPI-Phospholipase C of Nonessential But Influences Parasitemia in Mice. *The Journal of Cell Biology*, 103-114.
- Westley, S. (1984). *Annual Report 1983*. Nairobi: International Laboratory for Research on Animal Diseases (ILRAD).
- Woessner, J. J. (1991). Matrix metallopreteinases and their inhibitors in connective tissues remodeling. *Faseb J.*, 2145-2154.
- Yao, C., Donelson, J. E., & Wilson, M. (2003). The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania sp.* Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1-16.
- Ziegelbauer, K., Stahl, B., Karas, M., Stierhof, Y., & Overath, P. (1993). Proteolytic release of cell surface proteins during differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Biochem.*, 3737-3742.

Referências eletrônicas

<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAfrican.htm>

http://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/a_tryps.pdf

http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/TDR_SWG_01.pdf

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Sequências de <i>primers</i> utilizados para cada um dos mediadores e o tamanho respectivo dos pares de bases de cDNA amplificados.	42
Tabela 2.2 – Esquematização dos termociclos realizados para a amplificação dos diferentes <i>primers</i>	43
Tabela 3.1 –Dados resultantes da observação directa da evolução da infecção dos murganhos em ambos os grupos.....	47
Tabela 3.2 - Quantidade real de proteína, em ng, de cada amostra aplicada por poço ..	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Classificação taxonómica dos tripanossomas dos mamíferos.	8
Figura 1.2 - Morfologia da forma tripomastigota do tripanossoma.....	15
Figura 1.3 - Ciclo de Vida dos tripanossomas Africanos.	17
Figura 1.4 -Variação das formas de tripanossomas durante a parasitémia ondulante...	19
Figura 1.5 - As sucessivas ondas de parasitémia e a resposta humoral ao VAT dominante.....	21
Figura 1.6 - Acção das tetraciclinas.	28
Figura 1.7 - Estrutura bidimensional da minociclina.....	30
Figura 2.1 – A administração da minociclina com recurso a uma agulha de ponta romba.	32

Figura 2.2 -Esquema geral do desenho experimental..	33
Figura 2.3 – Esquema representativo da placa de microtitulação para a quantificação das quantidades de IL-4 em amostras de soro.	36
Figura 2.4 - Esquema representativo da placa de microtitulação para a quantificação das quantidades de IFN- γ em amostras de soro.	38
Figura 2.5 – Placa de microtitulação representativa das concentrações conhecidas de BSA para obtenção das concentrações das soluções contendo amostras de fígado e baço.....	44
Figura 3.1 - Representação dos resultados obtidos por zimografia para as amostras de fígado..	66
Figura 3.2 - Representação dos resultados obtidos por zimografia para as amostras de baço.....	68
Figura 3.3 – Gel de agarose a 2% com amplificação de um fragmento de 348 pb para cDNA de β -actina em todas as amostras de fígado.	70
Figura 3.4 - Gel de agarose a 2% com amplificação de um fragmento de 348 pb para cDNA de β -actina em todas as amostras de baço.	70
Figura 3.5 - Gel de agarose a 2% com amplificação de um fragmento de 167 pb para cDNA de IL-2 nas amostras de fígado.....	71
Figura 3.6 - Gel de agarose a 2% com amplificação de um fragmento de 167 pb para cDNA de IL-2 nas amostras de baço.	71
Figura 3.7 - Gel de agarose a 2% com amplificação de um fragmento de 154 pb para cDNA de IL-6 nas amostras de fígado.....	71
Figura 3.8 - Gel de agarose a 2% com amplificação de um fragmento de 154 pb para cDNA de IL-6 nas amostras de baço.	72
Figura 3.9 - Gel de agarose com amplificação de um fragmento de 243 pb para cDNA de INF- γ nas amostras de fígado.....	72
Figura 3.10 - Gel de agarose a 2% com amplificação de um fragmento de 243 pb para cDNA de IFN- γ nas amostras de baço.....	72

Figura 3.11 - Gel de agarose a 2% com amplificação de um fragmento de 307 pb para cDNA de TNF- α nas amostras de fígado.....	73
Figura 3.12 – Gel de agarose a 2% com amplificação de um fragmento de 307 pb para cDNA de TNF- α nas amostras de baço.	73
Figura 3.13 - Gel de agarose a 2,5 % com amplificação de um fragmento de 69 pb para cDNA de MMP 2 nas amostras de fígado e de baço.	73
Figura 3.14 - Gel de agarose a 2,5 % com amplificação de um fragmento de 71 pb para cDNA de MMP 9 nas amostras de fígado e de baço.	74
Figura 3.15 - Gel de agarose a 2,5 % com amplificação de um fragmento de 39 pb para cDNA de MMP 12 nas amostras de fígado e de baço.	74

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 3.1 - Massa corporal dos animais intervenientes na experiência ao longo do tempo..	48
Gráfico 3.2 – Tamanho dos baços dos animais sacrificados.	49
Gráfico 3.3 – Número de parasitas por unidade leucocitária.	50
Gráfico 3.4 - Concentração de Eritrócitos.	51
Gráfico 3.5 –Hematócrito..	52
Gráfico 3.6 - Concentração de Hemoglobina.	53
Gráfico 3.7 - Hemoglobina corpuscular média.....	54
Gráfico 3.8 - Concentração dos leucócitos	55
Gráfico 3.9 – Percentagem de Linfócitos no total de leucócitos.	55
Gráfico 3.10 - Concentração dos granulócitos.....	56
Gráfico 3.11 – Óxido Nítrico sérico.	57

Gráfico 3.12- Concentração de IL-4 sérica.....	58
Gráfico 3.13 - Concentração de IFN- γ sérico.	58
Gráfico 3.14 – Relação proporcional entre os perfis Th1 e Th2.....	59
Gráfico 3.15 - IgM total anti- <i>T.b.brucei</i>	60
Gráfico 3.16 - IgG total anti- <i>T.b.brucei</i>	61
Gráfico 3.17 - Subclasses de IgG específicas para <i>T.b.brucei</i>	62

ANEXO

Concentrações e grau de pureza de RNA total obtido das amostras de fígado e baço

0 DPI

CONTROLO	Amostra	Abs 260	Abs 260/280	[] RNA µg/mL	RNA para cDna (µg)	Vol. RNA total usado (µL)
Fígado	1	0.068	1.60	108.80	1	8.0
	2	0.182	1.79	291.20	1	2.4
	3	3.060	1.83	4896.00	1	0.2
Baço	4	0.468	1.9	748.80	1	1.34
	5	0.289	1.86	462.40	1	2.2
	6	0.371	1.92	593.60	1	1.6
TRATADO						
Fígado	7	1.250	1.89	2000.00	1	0.5
	8	2.080	1.85	3328.00	1	0.3
	9	0.565	1.79	888.00	1	1.3
Baço	10	0.127	1.73	203.20	1	5.0
	11	0.312	1.90	499.20	1	2.2
	12	0.476	1.84	761.60	1	1.3

Diluição 1:40
Volume 200 µL

5 DPI

CONTROLO	Amostra	Abs 260	Abs 260/280	[] RNA µg/mL	RNA para cDna (µg)	Vol. RNA total usado (µL)
Fígado	1	0.913	1.93	1460.80	1	0.7
	2	0.540	1.94	864.00	1	1.2
	3	1.410	1.98	2256.00	1	0.4
Baço	4	0.368	1.89	588.80	1	1.7
	5	0.500	1.90	800.00	1	1.3
	6	0.515	1.78	824.00	1	1.2
TRATADO						
Fígado	7	0.218	1.87	332.80	1	3.0
	8	2.060	1.89	2884.00	1	0.4
	9	0.218	1.90	348.80	1	2.9
Baço	10	0.410	1.89	656.00	1	1.5
	11	0.689	1.93	1102.40	1	0.9
	12	1.306	1.88	2089.60	1	0.5

Diluição 1:40
Volume 200 µL

8 DPI

CONTROLO	Amostra	Abs 260	Abs 260/280	[] RNA µg/mL	RNA para cDna (µg)	Vol. RNA total usado (µL)
Fígado	1	0.158	1.85	249.60	1	4.0
	2	0.681	1.89	1089.60	1	0.9
	3	0.918	1.92	1468.80	1	0.7
Baço	4	1.181	1.92	1889.60	1	0.5
	5	1.816	1.92	2905.60	1	0.3
	6	1.640	1.76	2624.00	1	0.4
TRATADO						
Fígado	7	0.944	1.86	1510.40	1	0.7
	8	0.593	1.91	948.80	1	1.0
	9	0.616	1.89	985.60	1	1.0
Baço	10	0.854	1.77	1366.40	1	0.7
	11	3.100	1.78	4960.00	1	0.2
	12	2.710	1.85	4336.00	1	0.2

Diluição 1:40
Volume 200 µL

13 DPI

CONTROLO	Amostra	Abs 260	Abs 260/280	[] RNA µg/mL	RNA para cDna (µg)	Vol. RNA total usado (µL)
Fígado	1	1.478	1.92	2364.80	1	0.4
	2	1.444	1.89	2310.40	1	0.4
	3	1.681	1.91	2689.60	1	0.4
Baço	4	3.790	1.51	6064.00	1	0.2
	5	2.670	1.86	4270.00	1	0.2
	6	2.67	1.85	4272.00	1	0.2
TRATADO						
Fígado	7	1.560	1.89	2496.00	1	0.4
	8	1.249	1.96	1974.40	1	0.5
	9	0.634	1.88	1014.40	1	1.0
Baço	10	2.754	1.85	4406.40	1	0.2
	11	3.117	1.80	4987.20	1	0.2
	12	1.940	1.90	3104.00	1	0.3

Diluição 1:40
Volume 200 µL

20 DPI

CONTROLO	Amostra	Abs 260	Abs 260/280	[] RNA µg/mL	RNA para cDna (µg)	Vol. RNA total usado (µL)
Fígado	1	1.300	1.89	2080.00	1	0.5
	2	0.960	1.81	1536.00	1	0.7
	3	1.133	1.85	1812.80	1	0.6
Baço	4	1.234	1.88	1974.40	1	0.5
	5	1.228	1.91	1964.80	1	0.5
	6	1.43	1.90	2292.80	1	0.4
TRATADO						
Fígado	7	1.970	1.88	3152.00	1	0.3
	8	0.419	1.89	670.40	1	1.5
	9	1.680	1.88	2688.00	1	0.4
Baço	10	3.050	1.81	4880.00	1	0.2
	11	1.060	1.86	1696.00	1	0.6
	12	1.600	1.84	2560.00	1	0.4

Diluição 1:40
Volume 200

l